

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele**

**Leptin vermittelte Signalübertragung und Proinsulingen-
Regulation in
 β -Zellen des endokrinen Pankreas**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Katharina Laubner
aus Würzburg**

Würzburg, September 2005

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. J. Seufert

Koreferent: Prof. Dr. med. H. Koepsell

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2006

Die Promovendin ist Ärztin

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	
1.1.	Diabetes Mellitus	1
1.2.	Diabetes Mellitus Typ 2	1
1.3.	Das Fettgewebshormon Leptin	3
1.4.	Signalübertragung von Leptin über den JAK-STAT-Signalübertragungsweg	5
1.5.	Suppressors of cytokine signalling (SOCS)	7
1.6.	Das Homeo Domain Protein PDX-1	9
1.7.	Die transkriptionellen Kofaktoren CBP und p300	11
1.8.	Regulation des Ratten-Insulingenpromotors 1	13
1.9.	Fragestellung	17
2.	Material und Methoden	
2.1.	Verbrauchsmaterialien und Geräte	18
2.2.	Chemikalien und weitere Reagenzien	18
2.3.	Enzyme	19
2.4.	Reagenziensätze (Kits)	19
2.5.	Antikörper	20
2.5.1.	Primärantikörper	20
2.5.2.	Sekundärantikörper	20
2.6.	DNA und Protein Größenstandards	21
2.7.	Oligonukleotid-Primer	21
2.8.	Plasmide	24
2.9.	Zelllinien und Zellkultur	29
2.9.1.	Die Zelllinie INS-1	29
2.9.2.	Die Zelllinie COS-7	30
2.9.3.	Stimulation der Zelllinien mit Leptin	31
2.9.4.	Fluoreszenzimmunzytochemie	31
2.9.5.	Transiente Transfektion mit Lipofektamine™ Reagent	33
2.9.6.	Luciferase-Reportergen Versuche	33

2.10.	RNA-Isolation, Reverse Transkription, Polymerase-Ketten-Reaktion und Auftrennung von DNA-Fragmenten	35
2.10.1.	RNA-Isolation mit TRIzol™ Reagent	35
2.10.2.	DNase I (Desoxyribonuclease I)-Verdau der Ribonukleinsäure	35
2.10.3.	Reverse Transkription	36
2.10.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.10.5.	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen	38
2.10.6.	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	39
2.11.	DNA-Sequenzierung	40
2.11.1.	Sequenzierungs-PCR	40
2.11.2.	Aufreinigung und Fällung der Proben	41
2.11.3.	Sequenzierung	41
2.12.	Bakterien	41
2.12.1.	Herstellung ultrakompetenter Bakterien	41
2.12.2.	Transformation mittels Hitzeschock	42
2.12.3.	Glyceroldauerkulturen	43
2.13.	DNA-Isolierung	44
2.13.1.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	44
2.13.2.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäureproben	44
2.14.	Methoden zur Herstellung von Expressionsplasmiden und Vektoren	45
2.14.1.	DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen	45
2.14.2.	Ligation mit der Gibco-T ₄ -DNA-Ligase	45
2.14.3.	Ligation mit dem TOPO™TA Cloning Kit	46
2.14.4.	QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	46
2.15.	Herstellung spezifischer Expressionsplasmide und Vektoren	47
2.15.1.	Herstellung des Expressionsplasmides rSTAT3pcDNA3.1-	47
2.15.2.	Herstellung des Luciferase-Reporter-gen-Vektors -410rINS-1mutSTATpGI3	48
2.15.3.	Herstellung der Deletionskonstrukte des Ratten- Insulingenpromotors 1	49
2.15.4.	Herstellung des Luciferase-Reporter-gen-Vektors	

-1054rSOCS3pGI3	51
2.15.5. Herstellung des Expressionsplasmides rSOCS3pcDNA3.1+	52
2.16. Proteinchemische Methoden	53
2.16.1. Herstellung von Ganzzellextrakten (Whole Cell Extracts; WCE)	53
2.16.2. Herstellung von Kernextrakten (Nuclear Extracts)	54
2.16.3. Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford	55
2.16.4. Immunpräzipitation mittels Protein-A-Sepharose	56
2.16.5. Western Blot	57
2.17. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	61
2.17.1. Radioaktive Markierung der DNA-Fragmente (Oligonukleotide)	62
2.17.2. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	62
2.18. <i>In vitro</i> Translation	64
3. Ergebnisse	
3.1. Expression der STAT-Isoformen in INS-1 Zellen	65
3.2. Zeitabhängige Rekrutierung von STAT3 und STAT5b an die Leptinrezeptor assoziierte Janus-Kinase 2 (JAK2)	66
3.3. Leptin bewirkt eine Translokation von STAT3 und STAT5b in den Zellkern	69
3.4. Untersuchungen zur Insulinpromotor Aktivität	71
3.4.1. STAT3 und STAT5b aktivieren den 410 Basenpaar langen Ratten-Insulingenpromotor 1 (-410rINS-1pGI3)	71
3.4.2. Die Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotors 1 durch STAT5b erfolgt nicht ausschließlich über das STAT responsive Element	72
3.4.3. CBP/p300 vermitteln die funktionelle Interaktion von STAT5b und PDX-1 am Ratten-Insulingenpromotor 1	75
3.5. Leptin und die Regulation der Insulingen Expression	78
3.5.1. Leptin induziert die Expression von SOCS3 in INS-1 Zellen	78
3.5.2. Leptin induziert die SOCS3 Expression über STAT vermittelte Promotoraktivierung	80
3.5.3. Leptin induziert die Bindung von STAT3 und STAT5b an spezifische STAT responsive Elemente im SOCS3 Promotor der Ratte in	

INS-1 Zellen	82
3.5.4. SOCS3 hemmt sowohl die basale als auch die STAT3 und STAT5b vermittelte Aktivierung des Ratten- Insulingenpromotors 1	85
4. Diskussion	
4.1. Leptinsignalübertragung in Insulin produzierenden Zellen des endokrinen Pankreas	87
4.2. Insulinpromotoraktivität	88
4.3. Einfluss von SOCS3 auf die Insulinpromotoraktivität	91
5. Zusammenfassung	95
6. Literaturverzeichnis	97
7. Danksagung	
8. Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist eine erbliche, chronische Stoffwechselerkrankung, die durch Störungen der Insulinsekretion und/oder der Insulinwirkung charakterisiert ist, was in einer Dysregulation des Glukosestoffwechsels resultiert. Hauptsymptom dieser Dysregulation ist die Hyperglykämie. Folgen der chronischen Hyperglykämie sind -meist erst nach längerer Krankheitsdauer- Dysfunktion und Versagen verschiedener Organe, insbesondere der Augen, der Niere, des Nervensystems, des Herzens und der Blutgefäße, was die Lebensqualität und Lebenserwartung deutlich einschränkt.

1997 wurden von der American Diabetes Association (ADA) neue Kriterien zur Klassifikation des Diabetes mellitus Typ 2 erarbeitet. Diese wurden von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) offiziell anerkannt und von der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) übernommen. Unterschieden wird der Diabetes mellitus Typ 1, der durch eine meist autoimmune Zerstörung der β -Zellen charakterisiert ist, so dass Insulin nicht mehr produziert und sezerniert werden kann und folglich ein absoluter Insulinmangel besteht (3). Weitere Gruppen sind der Diabetes mellitus Typ 2, der Gestationsdiabetes sowie spezifische Diabetes-Typen, zu denen unter anderem genetische Defekte der β -Zell-Funktion (z.B. MODY, mitochondrialer Diabetes), Erkrankungen des exokrinen Pankreas (z.B. zystische Fibrose, Pankreas-Tumoren, Pankreatitis), Endokrinopathien (z.B. Akromegalie, Cushing-Syndrom) und Medikamenten- oder Chemikalien induzierte Formen zählen (4).

1.2. Diabetes mellitus Typ 2

Diabetes mellitus Typ 2 ist sowohl durch β -Zell-Dysfunktion mit gestörter Insulinsekretion als auch durch Insulinresistenz der peripheren Zielgewebe wie Skelettmuskel, Leber, Fettgewebe gekennzeichnet (5, 6). Man geht heute von

einem multifaktoriellen Geschehen bei der Entstehung eines klinisch manifesten Diabetes mellitus Typ 2 aus. Das gleichzeitige Vorliegen einer peripheren Insulinresistenz und gestörten Insulinsekretion, in Wechselwirkung mit Umweltfaktoren wie Bewegungsmangel und vor allem Adipositas, sowie ein genetischer Hintergrund (6-11) tragen dazu bei. In unserer heutigen Gesellschaft mit zunehmendem Übergewicht der Bevölkerung und Bewegungsmangel spielt der Diabetes mellitus Typ 2, als so genannte Zivilisationskrankheit, eine immer wichtiger werdende Rolle. Üblicherweise manifestiert er sich im mittleren oder höheren Lebensalter und ist in allen Populationen häufiger vertreten als der Diabetes mellitus Typ 1. Ca. 90% aller Diabetiker in Deutschland sind an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt (12). Die Prävalenz hat in den letzten Jahrzehnten in Deutschland, wie in allen Industrienationen deutlich zugenommen und beträgt zurzeit ca. 5-8% (13, 14). Diese erhöhte Prävalenz ist streng mit dem vermehrten Auftreten einer Adipositas assoziiert. Adipöse Menschen zeigen in einem hohen Prozentsatz eine Insulinresistenz und Hyperinsulinämie, welche prädisponierende Faktoren für die Manifestation einer gestörten Glukosetoleranz und in der Folge eines Diabetes mellitus Typ 2 darstellen. Welche entscheidende Rolle die Adipositas bei der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 spielt, wird dadurch deutlich, dass zwischen 40 und 60% aller Diabetiker adipös sind und Gewichtszunahme, bzw. ein erhöhter BMI (ab einem BMI über 24,9 kg/m²) (15) das Diabetesrisiko signifikant erhöhen. Gemäß der Nurses'Health Studie ist ab einem BMI > 30 kg/m² das Risiko für einen Diabetes mellitus 30-fach erhöht im Vergleich zu schlanken Frauen (15, 16). Da erhöhte Körperfettmasse bzw. Adipositas ein zentraler Risikofaktor für die Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 ist (17), ist zu vermuten, dass es Wechselwirkungen bzw. Vermittler zwischen dem Fettgewebe, den Insulinzielgeweben und dem Pankreas gibt. Als Mediatoren kommen hierfür die vom Fettgewebe gebildeten Hormone wie Leptin und Resistin, TNF- α und freie Fettsäuren in Frage.

1.2. Das Fettgewebshormon Leptin

Leptin ist ein 16-kDa großes Peptidhormon, das nahezu ausschließlich vom weißen Fettgewebe produziert und sezerniert wird (18). Die Serumspiegel von Leptin korrelieren positiv mit der Masse des Fettgewebes (19). Über spezielle Regionen des Hypothalamus reguliert Leptin die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch (18, 20-23). Die Nahrungsaufnahme wird gehemmt und der Energieverbrauch gesteigert. Bei adipösen Menschen mit erhöhten Leptinserumspiegeln scheint dieser Mechanismus jedoch nicht wirksam zu sein, was auf eine Leptinresistenz bzw. einen Postrezeptordefekt hinweist (19, 24), da Adipositas-assoziierte Mutationen im Leptingen bzw. Leptinrezeptor sehr selten sind (25, 26).

Neben seinen Wirkungen am zentralen Nervensystem werden für Leptin eine Wirkung bei der Reproduktion (27), der Angiogenese (28), der Hämatopoese (29), dem Knochenstoffwechsel (30) und an den β -Zellen des endokrinen Pankreas beschrieben (31). Eine Verbindung zwischen Leptin und dem Glukosestoffwechsel konnte durch Untersuchungen an dem Tiermodell der *ob/ob* Maus, die eine Mutation im Leptingen aufweist, und der *db/db* Maus, die eine Mutation im Leptinrezeptor aufweist, hergestellt werden. Beide Mausmodelle weisen einen Diabetes mellitus Typ 2 Phänotyp auf und sind durch Adipositas, Hyperphagie, Hyperinsulinämie und Diabetes mellitus Typ 2 charakterisiert. Wird der *ob/ob*-Maus intraperitoneal Leptin zugeführt, so verliert sie ihren Diabetes mellitus Typ 2 Phänotyp (23, 32, 33). Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass Leptin direkte Effekte an Insulin produzierenden β -Zellen des endokrinen Pankreas ausübt. In der Tat konnte in β -Zellen des endokrinen Pankreas gezeigt werden, dass Leptinrezeptoren exprimiert werden und dass Leptin sowohl die Proinsulinen-Expression als auch die Insulinsekretion hemmt (34-36). Umgekehrt stimuliert Insulin, als adipogenes Hormon, die Produktion von Leptin durch die Adipozyten (37-40), so dass eine hormonelle Signalvermittlung zwischen endokrinem Pankreas und dem Fettgewebe besteht. Diese Beobachtungen etablierten die Existenz einer "Adipoinsulären Achse" (1, 41, 42).

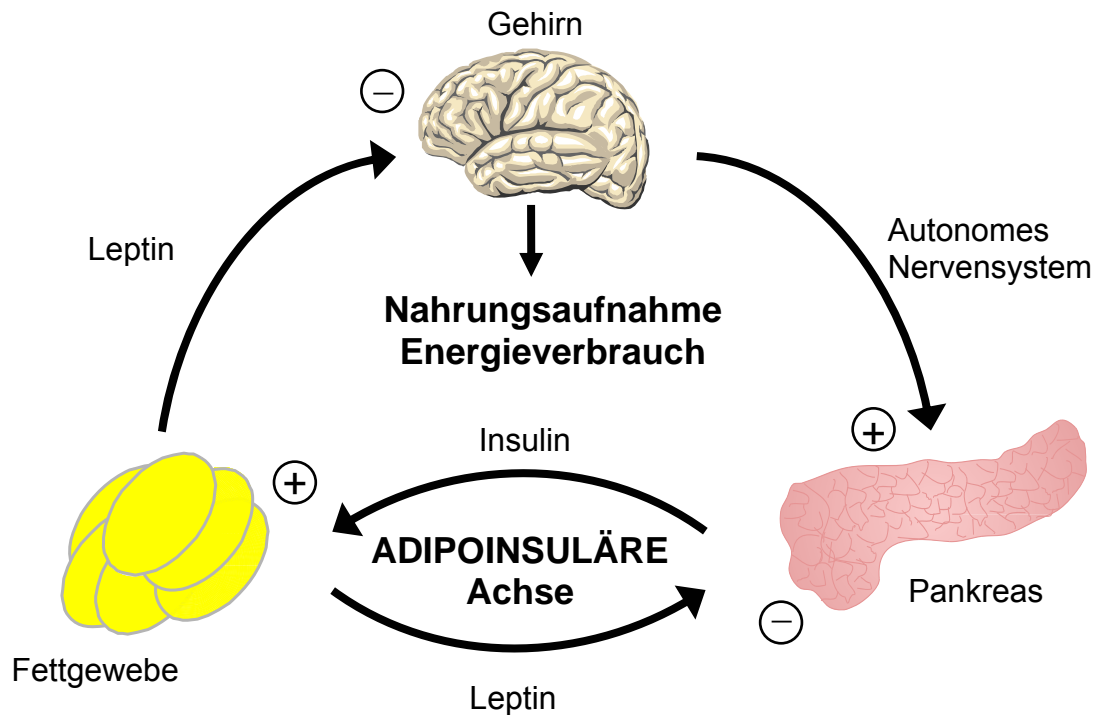


Abb.: 1.1.: Modell der Adiposinsulären Achse: Insulin stimuliert die Leptinsynthese und -sekretion durch das Fettgewebe. Leptin hemmt, im Sinne eines negativen "feed-back" die Insulinbiosynthese und -sekretion in β -Zellen des endokrinen Pankreas. Diese Signalübertragung integriert die Koppelung von Glukosehomöostase und Fettgewebsstatus in den Regelkreis der Steuerung des Energiehaushaltes durch Leptin. Leptin hemmt im Hypothalamus die Nahrungsaufnahme und stimuliert den Energieverbrauch. Modifiziert nach Seufert (2).

Dysregulation dieser "Adiposinsulären Achse" mit Hyperleptinämie und daraus resultierender Leptinresistenz in β -Zellen des endokrinen Pankreas führt zu einer chronischen Hyperinsulinämie, die bekanntermaßen zu vermehrter Adipogenese und Insulinresistenz führt und somit zu einem weiteren Anstieg der Plasmaleptinspiegel. Somit entsteht ein *circulus vitiosus* zwischen Fettgewebe und endokrinem Pankreas, der schließlich in einer β -Zell-Dysfunktion und damit in einem Diabetes mellitus Typ 2 mündet.

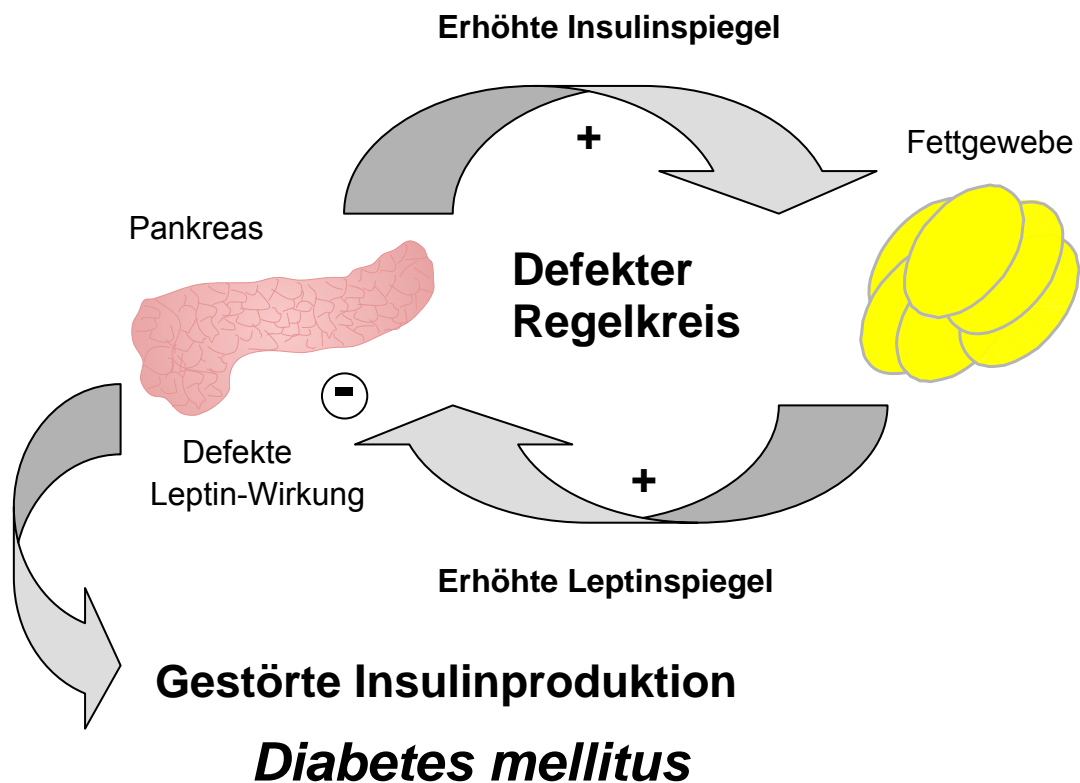


Abb.: 1.2.: Modell der Dysregulation der Adiposinsulären Achse: Fehlende Leptinwirkung an der β -Zelle führt zu Hyperinsulinämie, die durch Induktion von Adipogenese zur Vermehrung des Fettgewebes und zur Entwicklung einer Insulinresistenz führt. Vermehrung des Fettgewebes führt umgekehrt zur Hyperleptinämie, die zu einer Desensibilisierung der Leptin-Signalübertragung führt. Am Ende dieses *circulus vitiosus* steht die β -Zell-Dysfunktion mit gestörter Insulinproduktion und konsekutivem Auftreten eines Diabetes mellitus. Modifiziert nach Seufert (2).

1.3. Signalübertragung von Leptin über den JAK-STAT-Signalübertragungsweg

Strukturell gehört Leptin zu den Zytokinen (43). Seine Signalübertragung erfolgt über den Leptinrezeptor, der zu der Klasse 1 Rezeptoren der Zytokinfamilie zählt (44). Es konnten bislang fünf Leptinrezeptoren identifiziert werden (45), jedoch nur die lange Form (OB-R) des Leptinrezeptors ist funktionell aktiv. Über sie erfolgt die Signalübertragung von Leptin (46-50). Sie ist, wie für Zytokinrezeptoren der Klasse 1 üblich, an den JAK-STAT-Signalübertragungsweg gekoppelt (51). Die Expression der langen Form wurde

für β -Zellen der Ratte, humane β -Zellen sowie INS-1 Zellen gezeigt (34, 41, 52). Typisch für Zytokinrezeptoren der Klasse 1 ist, dass sie mit einer der drei bekannten Tyrosin-Kinasen, den Janus-Kinasen (JAK), assoziiert sind. An den Leptinrezeptor ist die Janus-Kinase 2 (JAK2) assoziiert. Durch Bindung von Leptin an seinen Rezeptor wird die Rezeptor assoziierte Janus-Kinase 2 an ihren Tyrosinresten transphosphoryliert und dadurch aktiviert. Die aktivierte JAK2 phosphoryliert im nächsten Schritt Tyrosinreste des cytoplasmatischen Anteils des Leptinrezeptors. Transkriptionsfaktoren aus der Familie der signal transducer and activator of transcription (STAT) können nun mit ihrer SH2-Domäne an den Rezeptor binden, um anschließend durch die Janus-Kinase 2 ebenfalls an Tyrosinresten phosphoryliert zu werden. Die SH2-Domäne (SRC homology 2 domain) ist eine hochkonservierte Domäne, die allen 7 bislang bekannten STATs (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6) gemeinsam ist. Sie wird benötigt für die Rekrutierung der STATs an den Rezeptor, für die Interaktion mit der Rezeptor assoziierten Janus-Kinase, die Dimerisierung der STATs sowie Bindung an spezifische DNA-Sequenzen. Nach Phosphorylierung der STATs dimerisieren diese und sind so in der Lage in den Zellkern zu wandern, um dort über DNA Bindung an spezifische DNA-Elemente die Expression verschiedener Gene zu regulieren (53-55).

Eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren aus der Familie der signal transducers and activators of transcription durch Leptin bzw. deren Beteiligung an der Leptinsignalübertragung konnte in mehreren Geweben, unter anderem auch im Hypothalamus, hier insbesondere für STAT1, STAT3, STAT5b und STAT6 (47-51, 54) gezeigt werden. In der Regel werden STATs als Aktivatoren der Genexpression (53, 55) beschrieben. In einer früheren Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass Leptin, als Hemmer der Insulinbiosynthese, eine verstärkte Bindung von STAT5b an STAT responsive Elemente im Ratten Insulinpromotor 1 bewirkt (34), so dass angenommen werden konnte, dass die Leptin bedingte Hemmung der Insulinbiosynthese durch STATs vermittelt wird. Da diese Aussagen zunächst im Gegensatz zueinander standen, war ein Ziel, dies auf molekularer Ebene näher zu charakterisieren.

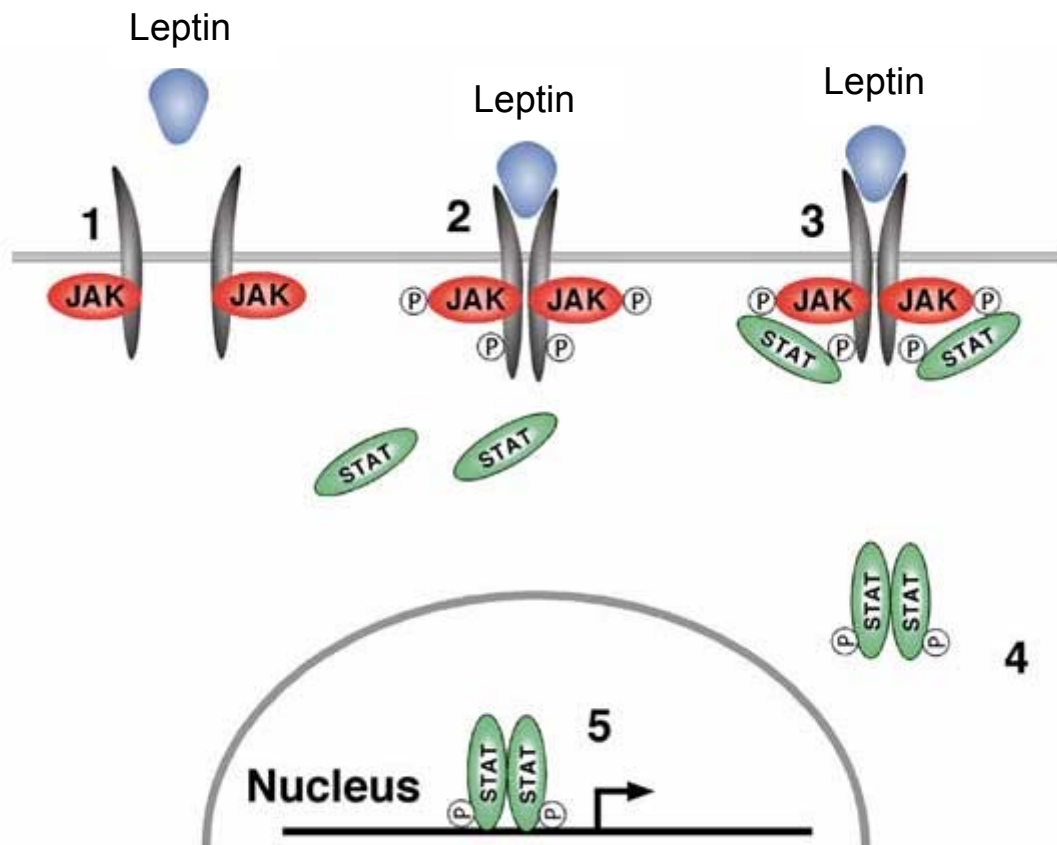


Abb.: 1.3.: JAK-STAT-Signalübertragungsweg: Nach Bindung des Liganden (Leptin) an seinen Rezeptor (1) wird dieser und die Rezeptor assoziierten JAKs phosphoryliert (2). STATs können nun an den Rezeptor binden und ebenfalls phosphoryliert werden (3). Sie sind so in der Lage zu dimerisieren (4), in den Kern zu translozieren um dort die Expression verschiedener Gene zu regulieren (5). Modifiziert nach www.mpibpc.gwdg.de/.../jahrg9/1.03/scta.html.

1.4. Suppressors of cytokine signalling (SOCS)

Suppressors of cytokine signalling, abgekürzt auch SOCS genannt, gehören zu einer Familie von Molekülen, die die Signalübertragung von Zytokinen über den JAK-STAT-Signalübertragungsweg hemmen (56). Diese Inhibitoren der JAK-STAT-Signalübertragung wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen kloniert, weshalb unterschiedliche Namen existieren. Synonyme für SOCS sind SSI (STAT-induced STAT-inhibitors) (57) und CIS (cytokine-inducible SH2 containing protein) (58, 59). Bisher besteht diese Familie aus 8 Proteinen, CIS und SOCS1-7 (60-62). Strukturell enthalten sie alle am C-terminalen Ende eine hochkonservierte, ca. 40 Aminosäuren lange SOCS Box, die Degradation der

SOCS Proteine zu verhindern scheint (63) und eine zentrale SH2 Domäne. Über ihre zentrale SH2 Domäne sind sie in der Lage, an phosphorylierte Tyrosinreste der Janus-Kinasen zu binden (59, 63) und diese dadurch zu inaktivieren (64). Am N-terminalen Ende haben sie eine unterschiedliche Länge und Aminosäuresequenz (60).

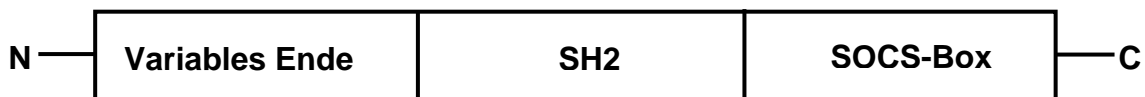


Abb. 1.4.: Struktur der Suppressors of cytokine signalling: Am N-terminalen Ende weisen sie eine variable Länge und Aminosäuresequenz auf. Zentral liegt die SH2 Domäne, die für die Bindung an und Inaktivierung der Janus-Kinasen nötig ist. Am C-terminalen Ende liegt die hochkonservierte, ca. 40 Aminosäuren lange SOCS-Box.

Die Expression der SOCS Proteine wird gewebspezifisch durch verschiedene Zytokine induziert, wie z.B. Interleukin-6, Interferon- γ , Erythropoietin, Wachstumshormon und auch Leptin (56, 57, 60, 65, 66). Ihre Expression wird über den JAK-STAT-Signalübertragungsweg reguliert (64, 67). Werden sie exprimiert, hemmen sie als negativer "Feed-back" Mechanismus die Signalübertragung der Zytokine über den JAK-STAT Signalübertragungsweg. Für die Signalübertragung von Leptin konnte dies bereits im Hypothalamus gezeigt werden (24, 54, 68). Zusammenfassend sind SOCS Proteine durch Zytokine, zu denen Leptin zählt, induzierbare Inhibitoren der Zytokinsignalübertragung über den JAK-STAT-Signalübertragungsweg.

Im Hypothalamus konnte, in Regionen, in denen die lange, also funktionell aktive Form des Leptinrezeptors vorhanden ist, eine vermehrte Expression von SOCS3 nach peripherer Gabe von Leptin nachgewiesen werden (24, 68). Überdies konnte in der Agouti Maus, einem Mausmodell, das unter anderem durch Hyperleptinämie und Leptinresistenz gekennzeichnet ist, gezeigt werden, dass im Hypothalamus die SOCS3 mRNA Expression gesteigert ist, im Vergleich zu normalen Mäusen (68). Diese vermehrte Expression von SOCS3 wird transkriptionell über STATs vermittelt, im Hypothalamus insbesondere über

STAT3 (24). In Mäusen, die mittels einer fetthaltigen Diät adipös wurden, beschränkt sich die gesteigerte Expression von SOCS3 auf die Region des Nucleus Arcuatus (69). Weiterhin wird vermutet, dass die STAT3 vermittelte Expression von SOCS3, die Leptin vermittelte JAK2 Phosphorylierung und somit die periphere Leptinwirkung sowohl im Hypothalamus als auch in transfizierten *Chinese hamster ovary* (CHO) Zellen hemmt (70). Erst vor kurzem konnte die SOCS3 vermittelte Hemmung der Leptin Signalübertragung im Hypothalamus in Sibirischen Hamstern als ein molekularer Mechanismus der periodischen, lichtabhängigen zentralen Leptinresistenz identifiziert werden (71). Interessanterweise deuten kürzlich publizierte *in vivo* Daten von neuronalen, zellspezifischen SOCS3 *knock-out* Mäusen, sowie von SOCS3 haploinsuffizienten Mäusen darauf hin, dass SOCS3 vermutlich ein Regulator sowohl der Leptinresistenz, als auch der Insulinresistenz zu sein scheint (72, 73). Zusammenfassend nimmt SOCS3 im Hypothalamus eine wichtige Rolle als Mediator der Leptinwirkungen, insbesondere im Hinblick auf Leptinresistenz, ein.

1.5. Das Homeo Domain Protein PDX-1

Auf der Suche nach Transkriptionsfaktoren, die zellspezifische Expression von Genen der Inselzellen des endokrinen Pankreas vermitteln, wurde 1993 erstmals der Insulin Promotor Factor 1 (IPF-1) aus einer Maus cDNA-Bibliothek kloniert (74). IDX-1 (insulin duodenum box 1) ist das Korrelat in der Ratte (75). STF-1 (somatostatin transactivating factor 1) (76) und PDX-1 (pancreas duodenal homeobox-1) sind identisch zu IDX-1. PDX-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der zu den Homeo Domain Proteinen zählt. Homeo-Box-Proteine sind in der Evolution hoch konserviert, weisen starke Homologien zwischen den verschiedenen Spezies auf und spielen während der Embryonalentwicklung und Gewebsdifferenzierung eine wesentliche Rolle. Sie enthalten eine in der Regel 61 Aminosäuren große Homeo-Box und bestehen

aus 3 α -Helices. Die Homeo-Box ist für die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen essentiell.

PDX-1 wird lediglich in den β -Zellen des endokrinen Pankreas, Somatostatin exprimierenden Zellen, einzelnen verstreut liegenden endokrinen Zellen im Duodenum sowie während der Entwicklung des Gehirns exprimiert (77, 78). Es besteht aus 283 Aminosäuren und ist 31 kDa groß. Die transkriptionelle Aktivierungsdomäne ist im N-terminalen Bereich von Aminosäure 1 – 38 lokalisiert. Die Homeo-Box, die für die Bindung von PDX-1 an spezifische DNA-Sequenzen benötigt wird, liegt an Position 146 – 206. Innerhalb dieser Homeo-Box liegt auch die Nukleäre Lokalisationssequenz (79, 80).

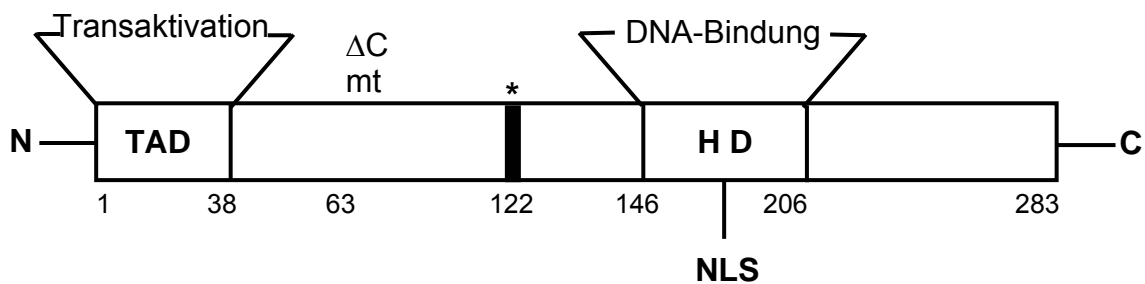


Abb.1.5.: Struktur des Homeo Domain Transkriptionsfaktors PDX-1. TAD: Transaktivierungsdomäne. Deletion reduziert die Aktivität auf 20% im Vergleich zu Kontrollen. Δ Cmt: Deletion des Cytosins (C) an Kodon 63 wurde in Familien mit MODY4 gefunden. Die Deletion bewirkt eine Beendigung der Translation an Kodon 122 (*). HD: Homeo-Box, die für die Bindung von PDX-1 an spezifische DNA-Sequenzen benötigt wird. NLS: Nukleäre Lokalisationssequenz. Beendigung der Translation an Position 122 verhindert die Bildung der DNA-Bindungsstelle und bewirkt somit die Inaktivierung von PDX-1.

PDX-1 ist der zentrale Regulator der Pankreasentwicklung. So weist z.B. die PDX-1 *knock-out* Maus eine Pankreasagenesie auf (81). Nach Verletzungen des Pankreas oder spezifischer Schädigung der β -Zellen des endokrinen Pankreas mit Streptozotocin ist eine vermehrte Expression von PDX-1 sowie eine β -Zell Neogenese zu beobachten (80, 82, 83). Eine β -Zell spezifische Inaktivierung des PDX-1 Genes nach Abschluss der Pankreasentwicklung, resultiert in einem Verlust des β -Zell Phänotyps, was letztendlich zu einer

gestörten Glukosetoleranz mit Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 führt (84). PDX-1 ist demnach nach Abschluss der Pankreasentwicklung in β -Zellen des endokrinen Pankreas ein wichtiger Regulator der Insulinproduktion.

Im Ratten-Insulingenpromotor 1 bindet PDX-1 an die A-Elemente (siehe 1.7.). PDX-1 vermittelt die Anpassung der Insulingen Expression an die extrazelluläre Glukosekonzentration und wird als Glukose sensibler Faktor beschrieben (85).

PDX-1 transloziert glukoseabhängig in den Zellkern und wird glukoseabhängig phosphoryliert, wodurch die DNA-Bindungsaffinität und damit das Transaktivierungspotential verstärkt werden. Umgekehrt bewirken anhaltend erhöhte Glukosespiegel eine Inhibition der Insulingen Expression sowie des PDX-1 Gens (86, 87). Darüber hinaus reguliert PDX-1 die Expression einer Reihe von Genen, die für die β -Zell Identität und Funktion unabdingbar sind. Hierzu zählen neben dem Insulingen (74), die Gene des Glukosetransporters 2 (GLUT2) (88), der Glukokinase (89) und des islet amyloid polypeptide (90).

Mutationen im PDX-1 Gen konnten als Ursache eines "maturity-onset diabetes of the young" (MODY), einem nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus, der autosomal-dominant vererbt wird und sich meist vor dem 30. Lebensjahr manifestiert, identifiziert werden. Beim MODY4 liegt eine inaktivierende Mutation des PDX-1 Gens vor (91).

Zusammenfassend zeigen diese Ausführungen, dass PDX-1 ein zentraler Regulator der β -Zell Entwicklung und Funktion ist und unentbehrlich für einen normale Glukosemetabolismus ist. PDX-1 spielt somit eine wichtige Rolle bei der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2.

1.6. Die transkriptionellen Kofaktoren CBP und p300

Auf der Suche nach Proteinen, die in der Lage sind, den durch Proteinkinase A (PKA) phosphorylierten Transkriptionsfaktor CREB, daher der Name CBP (CREB Binding Protein), zu binden wurde 1993 CBP erstmals kloniert (92). P300 wurde 1994 als Protein, das das adenovirale Protein E1A binden kann,

kloniert (93). CBP und p300 unterscheiden sich kaum in ihrer Aminosäuresequenz.

CBP und p300 sind Histon-Acetyltransferasen, die ubiquitär in Säugerzellen vorkommen und nicht zu den eigentlichen Transkriptionsfaktoren zählen, da sie nicht direkt an DNA-Sequenzen binden. CBP/p300 fungieren vielmehr als Kofaktoren, die die Interaktion zwischen zahlreichen Transkriptionsfaktoren bei der Genaktivierung vermitteln. Sie modulieren die Aktivität einer Reihe von Hauptaktivatoren der entsprechenden Gene, vor allem derer, die an der Regulierung der Zelldifferenzierung und Zellproliferation beteiligt sind (94). Bisher ist CBP/p300 meist als Koaktivator und nicht als Inhibitor beschrieben. E1A, das direkt an CBP/p300 bindet, kann durch seine Bindung verhindern, dass CBP/p300 als Koaktivator der verschiedenen Transkriptionsfaktoren fungiert (95). So wird z.B. durch E1A die Aktivität des Insulinpromotors gehemmt (96). CBP/p300 interagieren als Kofaktoren mit einer Reihe von Transkriptionsfaktoren aus verschiedenen Gruppen. Dazu zählen unter anderem nukleäre Rezeptoren (92), Leuzin Zipper Proteine (bZIP) wie Jun, Fos und CREB (92, 95, 97, 98) und Helix-Loop-Helix Proteine wie z.B. MyoD (99) und NeuroD1/BETA2 (100, 101). Für STAT1, STAT2, STAT3, STAT5b und STAT6 konnte ebenfalls eine Interaktion mit CBP/p300 gezeigt werden (102-105). Auch für PDX-1 konnte bislang mehrfach eine Interaktion mit CBP/p300 nachgewiesen werden (106-108), durch welche das Transaktivierungspotential von PDX-1 erhöht wird (106). Darüber hinaus wird postuliert, dass eine Interaktion von PDX-1 und CPB/p300 sogar nötig ist, damit PDX-1 seine Zielgene, insbesondere Insulin, aktivieren kann (106, 108).

Zusammenfassend sind die Koaktivatoren CBP/p300 wichtige Integratoren verschiedener Signalübertragungswege, unter anderem auch derer, die die Expression des Insulins betreffen.

1.7. Regulation des Ratten-Insulingenpromotors 1

Das Insulingen wird ausschließlich in β -Zellen des endokrinen Pankreas exprimiert. In den meisten Spezies existiert ein einziges Gen für Präproinsulin. Maus und Ratte besitzen je zwei Gene. In dieser Arbeit wurde auf den Ratten-Insulingenpromotor 1 fokussiert.

Die Regulation der Insulingen Transkription ist von einem komplexen Zusammenspiel verschiedener, spezifischer DNA-Sequenzen des Insulinpromotors mit einer Reihe ubiquitär vorkommender und auch Pankreasinsel spezifischer Transkriptionsfaktoren abhängig. Diese, für β -Zellen des endokrinen Pankreas spezifische und einzigartige Interaktion der Transkriptionsfaktoren, ist entscheidend für die Aktivierung bzw. Hemmung der Insulingen Expression, sowie deren Anpassung an verschiedene physiologische Stimuli. Abbildung 1.6. zeigt ausgewählte cis-agierende DNA-Bindungselemente des Ratten-Insulingenpromotors 1, sowie die daran bindenden Transkriptionsfaktoren.

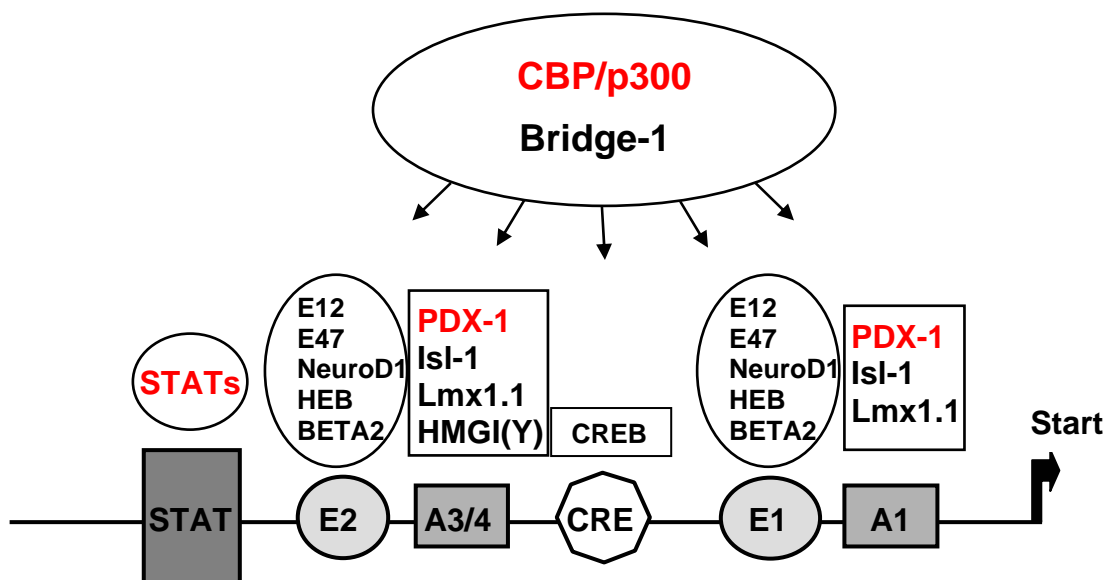


Abb.1.6.: Organisation des Ratten-Insulingenpromotors 1. Unten ist der Ratten-Insulingenpromotor 1 mit ausgewählten cis-agierenden Regulatorelementen aufgezeichnet. Die an die entsprechenden Elemente bindenden Transkriptionsfaktoren, ebenfalls nur auszugsweise, in der Reihe darüber. CBP/p300 und Bridge-1 interagieren als Kofaktoren mit mehreren der aufgezeichneten Transkriptionsfaktoren. Rot geschrieben sind die Faktoren, auf welche in dieser Arbeit fokussiert wurde.

Es ist eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren sowie Interaktionen, die bei der Regulation der Insulingen Expression eine Rolle spielen, bekannt. Im Folgenden sind ausgewählte, wichtige sowie für diese Arbeit interessante Regulatorelemente des Ratten-Insulingenpromotors 1, deren Bindungspartner und Interaktionen kurz beschrieben.

Die beiden E-Elemente (E1 und E2) im Ratten-Insulingenpromotor 1 enthalten eine übereinstimmende Sequenz mit der Basenfolge CANNTG. Es konnte in einer transfizierten Hamster Insulinomzelllinie gezeigt werden, dass Mutation einer der beiden Elemente in einer Reduktion der Promotoraktivität von 90% resultiert. An diese so genannten E-Box-Elemente binden als Heterodimere Transkriptionsfaktoren aus der Familie der basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Proteine, die starke Aktivatoren gewebsspezifischer Gene sind. Hierzu zählen E47/E12, Splicevarianten des E2A Genes, und HEB. Sie kommen ubiquitär vor, sind nicht gewebsspezifisch exprimiert und werden Klasse A bHLH Proteine genannt. E47/E12 interagiert mit dem Pankreasinsel spezifischen Klasse B bHLH Protein Beta-2, auch NeuroD genannt (siehe Übersichtsartikel 109, 110). Beta2/NeuroD1 werden lediglich im Gehirn (111) und den β - und α -Zellen des endokrinen Pankreas (112, 113) exprimiert. Sie regulieren sowohl die Insulingen Expression (114) als auch Pankreasentwicklung (113). Homozygot negative Mäuse für BETA2/NeuroD können keine normale Morphologie der β -Zellen entwickeln, ihre Insulingen Expression ist stark herabgesetzt, was in einen Diabetes mellitus Typ 2 mündet (113).

Die A-Elemente (A3/4 und A1) sind AT reiche Sequenzen im Ratten-Insulingenpromotor 1, deren Kernsequenz aus TAAT besteht. Mutation des A3/A4 Elementes resultiert in einer Reduktion der Promotoraktivität um 75%, während Mutation des A1 Elementes lediglich eine geringe Reduktion der Promotoraktivität bewirkt. An diese so genannten A-Elemente binden Homeo-Box-Proteine, zu denen PDX-1, ein zentraler Regulator der Insulingen Expression (siehe Abschnitt 1.5.) zählt (siehe Übersichtsartikel 109, 110). An die A-Elemente können noch weitere Homeodomain Proteine binden, so z.B. Lmx1.1, ebenfalls ein Aktivator des Insulingenpromotors, der zu den LIM Homeo-Box-Proteinen gehört. Isl-1 ist ebenfalls ein LIM Homeo-Box-Protein,

das an das A3 Element bindet, allerdings mit einer deutlich geringeren Affinität als LMX1.1 und die Insulinen Transkription aktiviert.

Am distalen 5'Ende ist eine Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Signal Transducers and Activators of Transcription, kurz STATs, bekannt. Diese Bindungsstelle wurde ursprünglich als Wachstumshormon responsives STAT5 Bindungselement im Ratten-Insulinenpromotor 1 identifiziert. Durch Bindung von STAT5b an dieses Element wird der Ratten-Insulinenpromotor 1 nach Stimulation mit Wachstumshormon aktiviert (115). Eine vermehrte Bindung von STAT5b an dieses STAT-Bindungselement ist dagegen mit der Leptin vermittelten Hemmung der Insulinen Expression verbunden (34).

Wie bereits oben erwähnt, erfolgt die β -Zellspezifische Expression des Insulins durch eine komplexe Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren. Hauptregulatoren, welche die basale und Glukose sensitive Insulinen Expression regulieren sind PDX-1, welches an das A3/A4-Element bindet, auch *Far* Element genannt, und Transkriptionsfaktoren aus der basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Familie, die an das E2-Element, auch *Flat* Element genannt, binden. Das A3/A4- und E2-Element oder auch *Far-Flat* Region bilden einen so genannten Minienhancer. PDX-1 und E47 aktivieren hierüber den Ratten-Insulinpromotor synergistisch (116-118). Darüber hinaus bildet PDX-1 mit E47, BETA2/NeuroD und HMGI (Y) (high mobility group protein I) einen Komplex, der den *Far-Flat* Minienhancer ebenfalls aktiviert. HMGI (Y) bindet dabei direkt an das A3/A4 Element und verstärkt somit den transkriptionellen Synergismus von PDX-1 und E47 (107). Auch das Homeodomain-Protein Lmx1.1 aktiviert synergistisch mit E47 den Ratten-Insulinenpromotor 1 (119). Die genauen Mechanismen, wie diese synergistische Aktivierung erfolgt, sind nicht vollständig geklärt. So wird postuliert, dass PDX-1, E47 und BETA2/NeuroD nicht nur über direkte Protein-Protein-Bindung interagieren, sondern auch über indirekte unter Beteiligung von Kofaktoren, wie Bridge-1 oder CBP/p300. Bridge-1 wird in β -Zellen des endokrinen Pankreas exprimiert und fungiert als Koaktivator, indem es die E12- und E47 vermittelte Aktivierung des Ratten-Insulinpromotors 1 verstärkt. Eine

Inaktivierung von Bridge-1 senkt die Aktivität des Ratten-Insulinpromotors 1 (120). Ein weiterer wichtiger Kofaktor ist CBP/p300 (siehe 1.6.). Für CBP/p300 sind Interaktionen mit BETA2/NeuroD beschrieben, die wesentlich für die Aktivierung der E-Elemente durch BETA2/NeuroD sind (101, 121). Weiterhin bildet CBP/p300 mit E12/47, Beta2 und PDX-1 einen transkriptionellen Komplex, der bei der Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotors 1 ebenfalls eine wesentlich Rolle spielt (80, 106, 108). Über synergistische Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotors 1 unter Einbezug von STATs ist bisher nichts beschrieben. Die molekularen Mechanismen und komplexen Interaktionen, die für die Aktivierung des Insulogens nötig sind, sind bisher bei weitem nicht vollständig verstanden und bedürfen weiterer Untersuchungen.

1.8. Fragestellung

Leptin hemmt in den β -Zellen des endokrinen Pankreas sowohl die Insulinbiosynthese als auch –sekretion (35, 36, 46). Intrazellulär ist die Signalübertragung von Leptin an den JAK-STAT-Signalübertragungsweg gekoppelt (51). STATs sind in der Regel als Aktivatoren und nicht Inhibitoren der Genexpression beschrieben (53, 55). In vorangehenden Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass die Leptin bedingte Hemmung der Insulinbiosynthese mit einer Bindung des Transkriptionsfaktors STAT5b an ein STAT responsives DNA-Element des Ratten-Insulinpromotors 1 verbunden ist (34), was zunächst im Gegensatz zu vorangehender Aussage steht. Der JAK-STAT-Signalübertragungsweg kann jedoch durch SOCS gehemmt werden (56). Im Hypothalamus konnte insbesondere für SOCS3 gezeigt werden, dass es bei der Signalübertragung von Leptin beteiligt ist und eine wichtige Rolle im Rahmen der Leptinresistenz spielt (24).

Die Regulation der Insulingen Expression ist von einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren abhängig (109, 110). Die Funktion der STATs ist hierbei noch nicht vollständig geklärt.

In diesem Zusammenhang ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Welchen Einfluss haben Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Signal Transducers and Activators of Transkription auf den Ratten-Insulingenpromotor 1, bzw. erfolgt die Hemmung des Ratten-Insulingenpromotors 1 durch Leptin direkt über STATs?
2. Gibt es Interaktionen zwischen STATs und anderen Transkriptionsfaktoren, insbesondere PDX-1, dem zentralen Regulator der Insulingen Expression, und Kofaktoren wie CBP/p300, die für die Regulation der Insulingen Expression wichtig sind?
3. Spielen SOCS-Moleküle bei der Signalübertragung im endokrinen Pankreas eine ähnlich Rolle wie im Hypothalamus?

2. Material und Methoden

2.1. Verbrauchsmaterialien und Geräte

Sämtliche Glas- und Plastikwaren wurden von den Firmen Eppendorf, Falcon, Greiner, Marienfeld, Sarsted, Becton Dickinson und Hartenstein bezogen.

Es wurden handelsübliche Geräte der Firmen Beckmann, Bio Rad, Eppendorf, Haereus, Hettich, Höfer, Hartenstein, Amersham Pharmacia Biotech oder Perkin Elmer benutzt. Spezielle Geräte sind im Folgenden aufgelistet:

- Carl-Zeiss, Göttingen, BRD: Fluoreszenzmikroskop Axioskop20
- Dynatech, Denkendorf, BRD: Mikrotiter[®]-Platten-Photometer
- Kodak, Stuttgart, BRD: Digitale Kamera
- Liebisch, Bielefeld, BRD: Heizblock
- Melag, Berlin, BRD: Autoklav
- Nichols Institute Diagnostics, Bad Vilbel, BRD: System Luminometer 400

2.2. Chemikalien und weitere Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

AMERSHAM	Buckinghamshire, UK
BECTON DICKINSON	Heidelberg, BRD
GIBCO™ INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES	Karlsruhe, BRD
J.T. BAKER	Deventer, Holland
MERCK	Darmstadt, BRD
PHARMACIA UPJOHN	Erlangen, BRD
ROTH	Karlsruhe, BRD
SIGMA	St. Louis, USA

2.3. Enzyme

Die Restriktionsendonukleasen mit entsprechenden Puffern wurden von den Firmen NEB (New England Biolabs, Frankfurt a. Main, BRD) und Promega (Mannheim, BRD) bezogen. Spezielle Enzyme sind unten aufgeführt.

- Calf intestine alkalische Phosphatase (CIAP) (Promega, Mannheim, Germany)
- DNase1 (Promega, Mannheim, BRD)
- Ex Taq™-Polymerase (Takara, Shiga, Japan)
- RNase-Inhibitor (Promega, Mannheim, BRD)
- SUPER SCRIPT™II (Gibco, Karlsruhe, BRD)
- T4-Ligase (Promega, Mannheim, BRD)

2.4. Reagenziensätze (Kits)

- Big-Dye-Mix (PE Applied Biosystems/ABI PRISM, Forster City, USA)
- ECL Western Blotting Detection Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)
- QIAquick-Gel-Extraktion-Kit (Qiagen, Valencia, USA)
- QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Kirkland, USA)
- TOPO™TA Cloning Kit (Invitrogen, Life Technologies, Karlsruhe, BRD)
- Rapid-Pure-Miniprep-Kit (RPM)™ und Rapid-Pure-Mini-Monsterprep (RPM 4G)™ (BIO101, Spicewood, USA)
- TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega, Mannheim, BRD)

2.5. Antikörper

2.5.1 Primärantikörper

STAT1 (M-22): Rabbit polyclonal IgG; cat# sc-592 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)

STAT3 (H-190): Rabbit polyclonal IgG; cat# sc-7179 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)

STAT5b (C-17): Rabbit polyclonal IgG; cat# sc-835X (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)

JAK2 (C-20): Rabbit polyclonal IgG; cat# sc-294 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)

Anti-Phosphotyrosine, clone 4G10: mouse monoclonal IgG; cat# 05-321 (Upstate biotechnology, Lake Placid, USA)

2.5.2. Sekundärantikörper

Donkey anti-Rabbit Cy3: für Färbungen, Verdünnung 1:800; cat# 111-165-152 (Jackson immuno Research laboratories, Inc., Cambridgeshire, UK)

Donkey anti-Rabbit HRP: für Western Blot, Verdünnung 1:10000; cat# NA 934 (Amersham Buckinghamshire, UK)

2.6. DNA und Protein Größenstandards (Gibco)

100 bp DNA-Marker (0,1 µg/µl):	Fragmentgröße von 100 bp–2072 bp
1 kbp DNA-Marker (0,1 µg/µl):	Fragmentgröße von 201 bp–12216 bp
Low-range-Proteinmaker (1mg/ml):	Fragmentgröße von 14,3 kDa–200 kDa

2.7. Oligonukleotid-Primer

Diese wurden von Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK bezogen.

Primer für Mutation der STAT-Bindungsstelle (fett gedruckt) im Ratten-Insulingenpromotor 1:

- mINSTAT-2 (sense):
5'-⁻³⁴³CAACTGCAACTT**CAGTTT**AATGAGGTGG⁻³¹⁵-3'
- mINSTAT-B (antisense):
5'-⁻³⁴³CCACCTCATTT**AAACTGA**AGTTGCAGTTG⁻³¹⁵-3'

Primer zur Herstellung der –410rINS-1pGL3 Deletionskonstrukte (GenBank Accession Number J00747):

- rINSp-1 (für –359rINS-1pGL3):
5'-⁻³⁵⁹GATACCAGGTCCCCAACA**ACTGC**⁻³³⁷-3'
- rINSp-2 (für –230rINS-1pGL3):
5'-⁻²³⁰GCCCCTTGTTAATAATCTAATTACCC⁻²⁰⁴-3'
- rINSp-3 (für –190rINS-1pGL3):
5'-⁻¹⁹⁰GTTGTTGACGTCCAATGAGCGCTTTC⁻¹⁶⁵-3'
- rINSp-4 (für –119rINS-1pGL3):
5'-⁻¹¹⁹CCCTCTCGCCATCTGCCTACCTACCC⁻⁹³-3'
- rINSp-5 (für –90rINS-1pGL3):
5'-⁻⁹⁰CTAGAGCCCTTAATGGGCCAAAC⁻⁶⁸-3'
- pGI2A.S (entspricht Glprimer2 im pGL3-Basic Vector):
5'-CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCC-3'

Primer zum Nachweis von STATs in INS-1 Zellen:

- STAT1 (PCR-Produkt: 264 bp; GenBank Accession Number AF053767):
sense 5'-TGAAGTCCATCGAGCTCACTCAGAACAT-3'
antisense 5'-AGAGGACGAAGGTGCGATCGGATAAC-3'
- STAT2 (PCR-Produkt: 140 bp; GenBank Accession Number BC064827):
sense 5'-GAAGGGGGCATTACTTGTCTTGGGTGGA-3'
antisense 5'-GCGGATGATCTCTGCCAGTGGGAGTGAC-3'
- STAT3 (PCR-Produkt: 545 bp; GenBank Accession Number X91819):
sense 5'-TGGAAGAGGCGGCAGCAGATAGC-3'
antisense 5'-GCACGGCCCCATTCCCACAT-3'
- STAT4 (PCR-Produkt: 208 bp; GenBank Accession Number AF055291):
sense 5'-AAACTATGGCAACAATTCTCCTTCAAAC-3'
antisense 5'-GCCGCAGCCAGTATTCTCCTCT-3'
- STAT5a (PCR-Produkt: 105 bp; GenBank Accession Number U24175):
sense 5'-GCAACATTTCCCATCGAGGTCCGGCACTACC-3'
antisense 5'-GTGGCCTGGCCTCGGTCCTGGGGATTG-3'
- STAT5b (PCR-Produkt: 230 bp; GenBank Accession Number X97541):
sense 5'-GCCAGCATTTCATCGAGGTGCGACATTATTTA-3'
antisense 5'-GTCATACGTGTTCTGGAGCTGCGTGGCATAGTGC-3'
- STAT6 (PCR-Produkt: 341 bp; GenBank Accession Number AF055292):
sense 5'-CCAGCCGGGGACTGCTACCAGAACAACACTTC-3'
antisense 5'-CCGGATGACATGGGCAATGGTGATGC-3'

Primer zum Nachweis von SOCS-3 in INS-1 Zellen und zur Klonierung von rSOCS3pcDNA3.1+ (entspricht coding sequence; PCR-Produkt 699 bp; GenBank Accession Number AJ249240):

- rSOCS3-2 (sense):
5'-GCTCCGTGCGCCATGGTCACCCACAG-3'
- rSOCS3-B (antisense):
5'-CTTTGCTCTTTAAAGTGGAGCATCATACTG-3'

Primer zur Klonierung des –1054rSOCS3pGL3 Promotors (PCR-Produkt 1276 bp, GenBank Accession Number AJ249240):

- rSOCS3-3 (sense):
5'-TCTCTTCTGGATTCCCCACTCCTGTTCTTGAA-3'
- rSOCS3-C (antisense):
5'-CCGTGCGCCCAGATGTTGGCAGCCGTGAAGTCTA-3'

Primer für Gelshiftanalysen enthalten bekannte STAT-Bindungsstellen (fett gedruckt) im SOCS-3 Promotor (GenBank Accesson Number AJ249240):

- A-STAT:
5'-⁻³⁶³AGAAACCAGCCTT**CTTAGA**AGGGAGGGGGTGG⁻³³²-3'
- B-STAT:
5'-⁻¹⁰⁷AGTGACTAAACATT**CAAGA**AGACCGGCCGCGC⁻⁷⁵-3'
- C-STAT:
5'-⁻⁸³CGGCCGCGCAGTT**CCAGGA**ATCGGGGGGGCGG⁻⁵²-3'

Primer zur Klonierung von rSTAT3pcDNA3.1- (PCR-Produkt 2313 bp, GenBank Accession Number NM012747):

- rSTAT3-2 (sense):
5'-ATGGCTCAGTGGAACCAGCTCCAGCAG-3'
- rSTAT3-B (antisense):
5'-CTGTAGCTTTGCCTTTCAGCTCCTCACATCGGG-3'

Primer für Sequenzierung (aus pCR[®]2.1-TOPO Vektor):

- M13 (reverse Primer):
5'- CAGGAAACAGCTATGAC-3'
- T7 (forward Primer)
5'CCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'

2.8. Plasmide

- pCR[®]2.1-TOPO[®] (3.9 kbp) (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, BRD): Dieser Vektor wurde für direkte PCR-Klonierungen mittels TOPO TA Cloning[®] verwendet und mit dem Kit geliefert. Die Multiple cloning site ist im LacZ α Fragment enthalten. Kan^r und Amp^r.

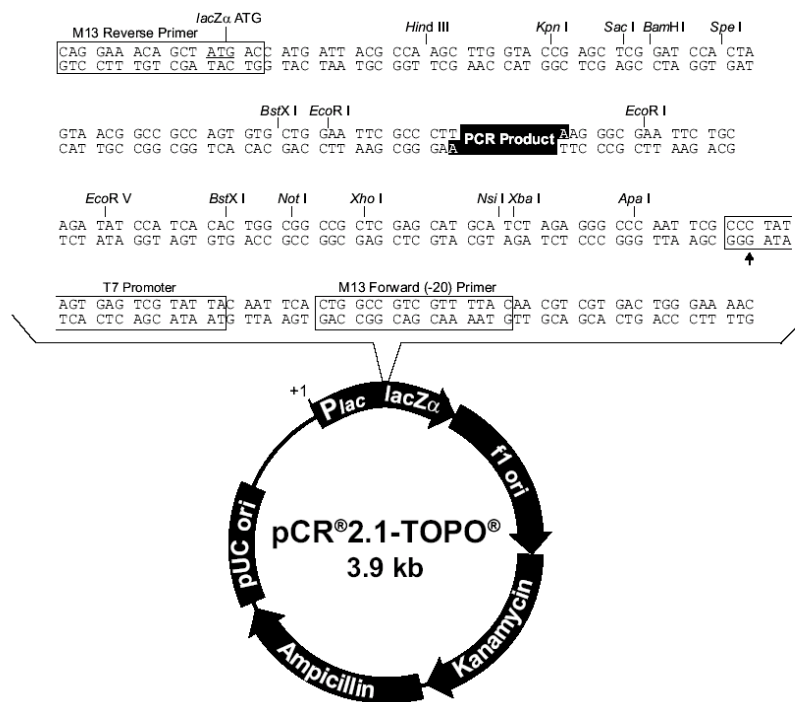


Abb. 2.1.: pCR[®]2.1-TOPO[®]. Dieser Vektor wurde für PCR-Klonierungen verwendet.

- pGL3-Basic Vector (4818 bp) (Promega, Mannheim, BRD): Dieser Vektor enthält die kodierende Sequenz für die modifizierte firefly Luciferase (*luc+*). Er wurde zur Klonierung sämtlicher Vektoren, die später in Luciferase-Reporter-Gen-Versuchen eingesetzt wurden, verwendet.

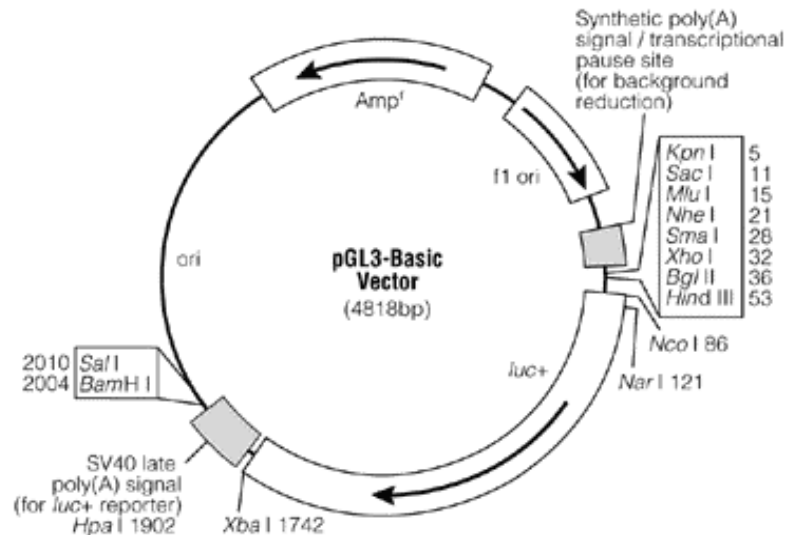


Abb. 2.2.: pGL3-Basic Vektor. Dieser Vektor enthält die kodierende Sequenz für die modifizierte firefly Luciferase (*luc +*).

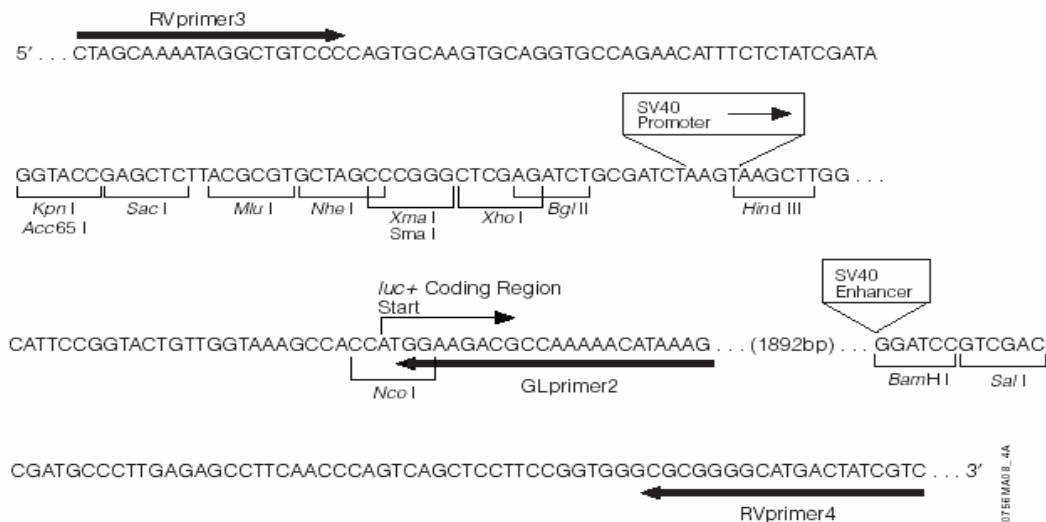


Abb. 2.3.:pGL3-Basic Vektor-Multiple Cloning Site. Darstellung der Basensequenz, sowie der verschiedenen Enzymschnittstellen und Lokalisation der Sequenzierungsprimer GLprimer2, RVprimer3 und RVprimer4 im pGL3-Basic-Vektor.

- -410rINS1pGL3 (5.3 kb), -307rINS1pGL3 (5.2 kb), -160rINS1pGL3 (5.1 kb). Diese Vektoren wurden von Seufert et al. 1997 (34) kloniert. Sie enthalten die kodierende Sequenz für die modifizierte firefly Luciferase (*luc+*) unter der Kontrolle des 410 bp, 301 bp bzw. 160 bp langen Ratten-Insulingenpromotors 1. Amp^r.

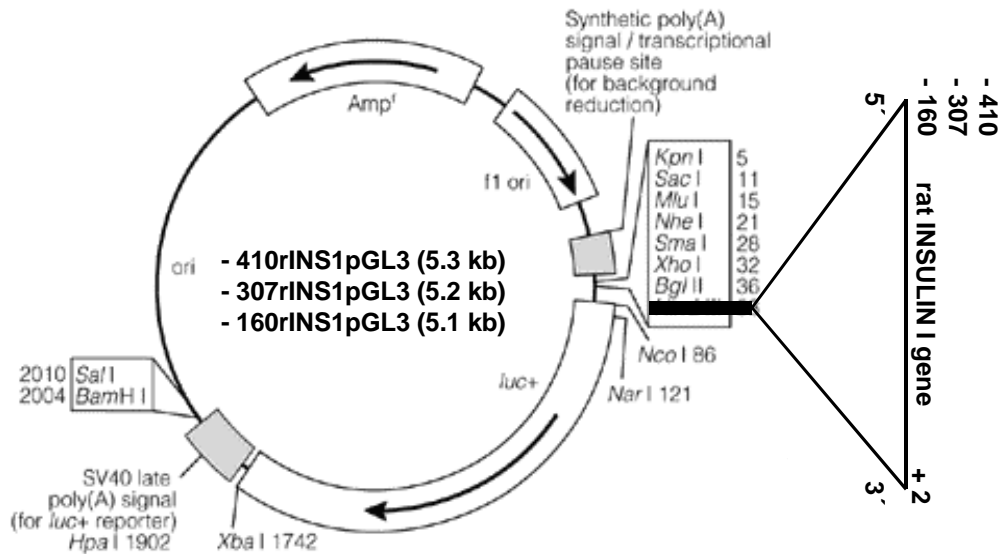


Abb. 2.4.: -410rINS1pGL3, -307rINS1pGL3, -160rINS1pGL3. Diese Vektoren enthalten den 410, 307 bzw. den 160 bp langen Ratten-Insulingenpromotor 1.

- -410rINS1mutSTATpGL3 (5.3 kb). Dieser Vektor wurde in dieser Arbeit kloniert. Er enthält die kodierende Sequenz für die modifizierte firefly Luciferase (*luc+*) unter der Kontrolle des 410 bp langen Ratten-Insulingenpromotors 1 mit einer mutierten STAT-Bindungsstelle. Amp^r. Siehe 2.15.2.
- -359rINS1pGL3, -230rINS1pGL3, -190rINS1pGL3 und -90rINS1pGL3 sind Deletionskonstrukte des Plasmides -401rINS1pGL3. Amp^r. Siehe 2.15.3.

- -1054rSOCS3pGL3 (6.0 kb). Dieser Vektor enthält die kodierende Sequenz für die modifizierte firefly Luciferase (luc+) unter der Kontrolle des 1054 bp langen SOCS3 Promotors der Ratte. Er wurde in dieser Arbeit kloniert. Amp^r. Siehe 2.15.4.
- pcDNA3.1 (+/-) (5428/5427 bp) (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, BRD). Eukaryotische Expressionsvektoren, die als Ausgangsvektoren für die Expressionsplasmide rSTAT3pcDNA3.1-, rSTAT5bpcDNA3.1- und rSOCS3pcDNA3.1+ verwendet wurden. Amp^r, Neo^r.

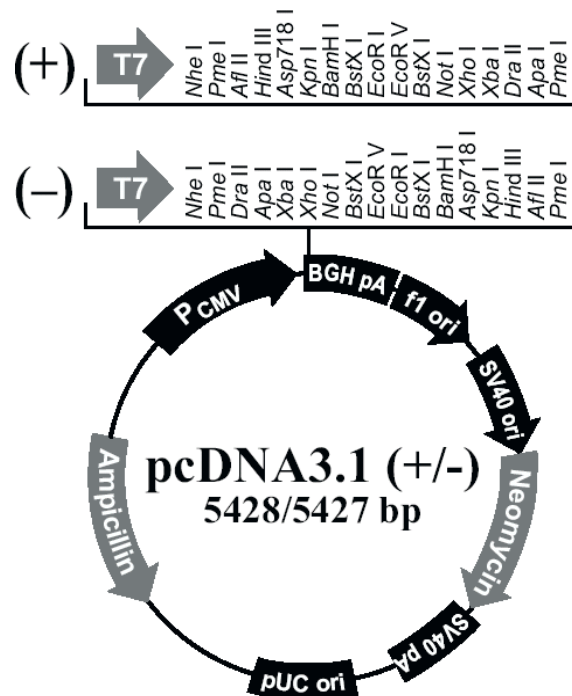


Abb. 2.5.: pcDNA3.1-. Eukaryotische Expressionsplasmide, die als Ausgangsplasmide für rSTAT3pcDNA3.1-, rSTAT5bpcDNA3.1- und rSOCS3pcDNA3.1- dienen.

- rSTAT5bpcDNA3.1- (9 kb). Eukaryotischer Expressionsvektor für die Expression von STAT5b der Ratte. Er war eine freundliche Gabe von Yu-Lee, Baylor College, Texas, USA. Amp^r, Neo^r.

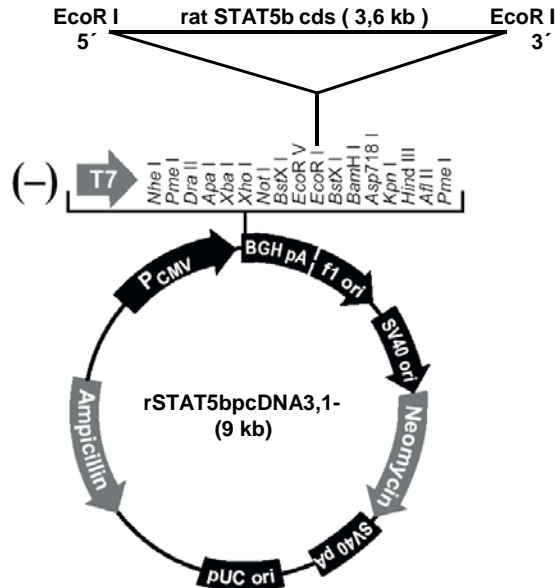


Abb. 2.6.: rSTAT5bpcDNA3.1-. Eukaryotisches Expressionsplasmid für die Expression von STAT5b der Ratte.

- rSTAT3pcDNA3.1- (7.7 kb). Eukaryotisches Expressionsplasmid für die Expression von STAT3 der Ratte. Es wurde in dieser Arbeit hergestellt. Amp^r, Neo^r. Siehe 2.15.1.
- rSOCS3pcDNA3.1+ (6.1 kb). Eukaryotisches Expressionsplasmid für die Expression von SOCS3 der Ratte. Es wurde in dieser Arbeit hergestellt. Amp^r, Neo^r. Siehe 2.15.5.
- p300 und E1A. Eukaryotische Expressionsplasmide für die Expression von p300 und E1A. Sie waren eine freundliche Gabe von Pfitzner et al. (93, 104). Über die genaue Plasmidstruktur ist nichts bekannt.

- rPDX-1pcDNA3 (6.8 kb). Eukaryotisches Expressionsplasmid, für die Expression von PDX-1 der Ratte. Es wurde von M. Hussain in Boston kloniert. Amp^r, Neo^r.

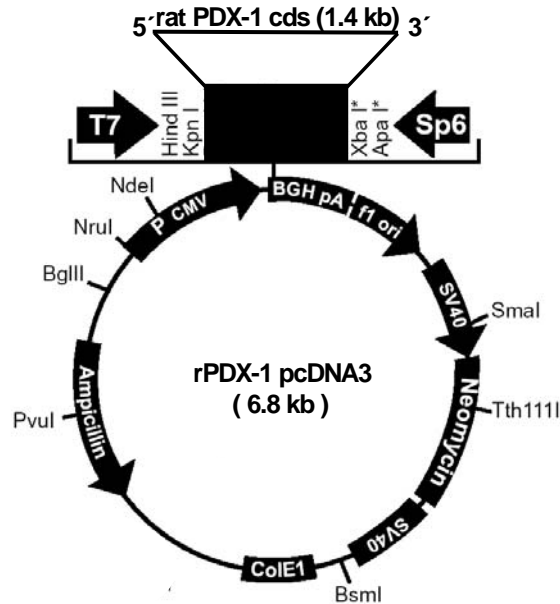


Abb. 2.7.: rPDX-1pcDNA3. Eukaryotisches Expressionsplasmid für die Expression von PDX-1 der Ratte.

2.9. Zelllinien und Zellkultur

2.9.1 Die Zelllinie INS-1

Insulinproduzierende Ratteninsulinom-Zelllinie als Modell für β -Zellen des endokrinen Pankreas. Sie wurde von Claes B. Wollheim und seiner Arbeitsgruppe aus Zellen eines durch Röntgenstrahlen induzierten Ratteninsulinoms entwickelt (122). Morphologisch ist sie nativen β -Zellen sehr ähnlich und produziert, speichert und sezerniert glukoseabhängig Insulin, aber keines der anderen drei Hormone des endokrinen Pankreas. Diese Ziellinie wächst adhärent als Monolayerkultur. Ihre Verdopplungszeit beträgt 100 h. Unter Zusatz von β -Mercapthoethenol zur Erhaltung des Differenzierungsgrades, bleiben die strukturellen und funktionellen

Eigenschaften der INS-1 Zellen bis ca. 80 Passagen unverändert. Die Zellen wurden im Gewebebrutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Die INS-1 Zellen wurden direkt von Claes B. Wollheim (Abteilung für Klinische Biochemie und experimentelle Diabetologie, Universität Genf, Schweiz) bezogen.

Zellkulturmedium:

RPMI[®]1640 (ohne Glutamin, mit 11.1 mM Glukose), 10% hitzeinaktiviertes fetales Rinderserum (FBS), 1% HEPES (10 mM), 1% L-Glutamin (2 mM), 1% Penicillin/Streptomycin (100 U/ml), 1% Natrium Pyruvat (1 mM) und 0,1% β-Mercaptoethanol (50 μM).

Einfriermedium:

Kulturmedium mit zusätzlich 10% FBS und 5% DMSO.

2.9.2. Die Zelllinie COS-7

Bei der COS-7 Zelllinie handelt es sich um Nierentumorzellen der afrikanischen Affenart Cercopithecus aethiops. Es sind Fibroblasten ähnliche Zellen, die mit dem SV40-Virus T-Antigen stabil transformiert wurden. Diese Zelllinie wächst ebenfalls adhärent als Monolayerkultur. Die Zellen wurden im Gewebebrutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Bezogen wurden sie über ATCC, Manassas, USA (Cat. No. CRL-1651).

Zellkulturmedium:

Dulbecco`s modified Eagle`s medium (DMEM[®]), 10% hitzeinaktiviertes, fetales Rinderserum, 1% Penicillin/Streptomycin (100 U/ml).

Einfriermedium:

Kulturmedium mit 10% FBS und 5% DMSO.

2.9.3. Stimulation der Zelllinien mit Leptin

Eine konfluente 10 cm Zellkulturschale INS-1 Zellen wurde im Verhältnis 1:2 auf 10 cm Zellkulturschalen gesplittet. Nach 12 h wurden die Zellen mit Stimulationsmedium einmalig gewaschen. Nach 12 - 15 h Wachstum mit Stimulationsmedium wurden die Zellen mit 6,25 nM (100 ng/ml) Leptin (R&D Systems, Wiesbaden, BRD) für verschiedene Zeitperioden stimuliert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel mit neuem Stimulationsmedium und Hormon, da es sich bei Leptin und Wachstumshormon um Peptidhormone handelt, die nach einer gewissen Zeit abgebaut werden. In den Kontrollansätzen wurden die Zellen mit Vehikel statt Hormon stimuliert. Für Leptin war die Kontrolle dessen Lösungsmittel, bestehend aus 15 mM HCl und 7,5 mM NaCl.

Stimulationsmedium:

Zellkulturmedium ohne FBS und Antibiotika. Statt dessen 0,1% BSA und 1% Trasylol (Proteinaseinhibitor; Bayer, Leverkusen, BRD).

2.9.4. Fluoreszenzimmunzytochemie

Sialinisieren von Glasobjektträgern

Damit sich die INS-1 Zellen auf normalen Glasobjektträgern anheften konnten, mussten diese zunächst sialiniert werden. Die Objektträger wurden hierzu bei Raumtemperatur zunächst 5 min in Aceton gewaschen und anschließend 5 min in 2% Triethoxysilylpropylamin, das in Aceton gelöst war, inkubiert. Danach wurden sie zweimal in steriles Wasser eingetaucht und über Nacht staubfrei getrocknet. Vor Gebrauch wurden sie 20 min in 70% Ethanol gestellt, um Sterilität zu erreichen.

Immunfluoreszenz

Konfluente INS-1 Zellen einer 10 cm Zellkulturschale wurden im Verhältnis 1:12 auf sialinisierte Objektträger gesplittet und wie oben beschrieben mit 6,25 nM (100 ng/ml) Leptin bzw. entsprechendem Vehikel stimuliert. Zur immunocytochemischen Anfärbung intrazellulärer Proteine wurden die Zellen bei Stimulationsende mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 5 min auf den Objektträgern fixiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit PBS erfolgte die Permeabilisierung durch Inkubation mit -20°C kaltem Methanol für 5 min. Nach nochmaligem Waschgang wurden die Zellen für 15 min mit 3% Eselserum, verdünnt in PBS, bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung an Zellproteine zu blockieren. Anschließend wurden die Zellen mit dem spezifischen Primärantikörper (siehe 2.5.1.) in gewünschter Konzentration (Verdünnung STAT3 1:1000; Verdünnung STAT5b 1:100) verdünnt in PBS, 1 bis 2 h bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach Wiederholen des Waschschrattes wurden die Zellen 15 min mit 3% Ziegenserum, verdünnt in PBS, inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren. Anschließend wurden die Zellen mit dem sekundären Antikörper für 30 min im Dunkeln und bei Raumtemperatur inkubiert. Bei dem sekundären Antikörper handelt es sich um einen fluoreszenzmarkierten Antikörper, der mit Cy3 (Indocarbocyanid) gekoppelt ist und spezifisch das Fc-Epitop des spezifischen Antikörpers erkennt. Abschließend wurde nochmals mit PBS gewaschen, die Objektträger mit einem Tropfen Immersionsöl (Immun Mount, Shandon, Pittsburgh, USA) benetzt und mit einem Deckglas abgedeckt. Die gefärbten Zellen wurden unter einem Epifluoreszenzmikroskop, das an eine Optronics TEC-470 CCD-Kamera gekoppelt war, analysiert. Verarbeitet wurden die Bild-Daten mittels spezifischer Software (IP-Lab Spectrum, Signal Analytics Co.) an einem Macintosh Computer.

2.9.5. Transiente Transfektion mit Lipofektamine™ Reagent

Für Transfektionsexperimente wurden Zellen einer konfluenten 10 cm Zellkulturschale im Verhältnis 1:8 (INS-1 Zellen) bzw. 1:12 (COS-7 Zellen) auf 6 cm Zellkulturschalen gesplittet. Bei einer Konfluenz von 50-70 %, die nach 18-24 h erreicht war, wurden die Zellen transfiziert. Pro Ansatz wurden 3-6 µg DNA, 8 µl Lipofektamine™ Reagent (Gibco™ Invitrogen life Technologies, Karlsruhe, BRD) und 600 µl Tx-Medium gemäß Herstellerprotokoll gemischt. Die Ansätze wurden 30-45 min bei Raumtemperatur inkubiert, um der DNA das Eindringen in die Liposomen zu ermöglichen. Zwischenzeitlich wurden die Zellen einmalig mit Tx-Medium gewaschen, um Serum- und Antibiotikarückstände zu beseitigen, welche die Transfektionseffizienz erniedrigen könnten. Nach dem Waschen wurde pro Platte 2,4 ml Tx-Medium vorgelegt und anschließend das Transfektionsgemisch dazugegeben. Nach 8-12 h erhielten die Zellen 3 ml normales Zellkulturmedium und wurden 48 bis max. 72 h kultiviert.

Tx-Medium:

Entsprechendes Zellkulturmedium ohne FBS und Antibiotika.

2.9.6. Luciferase-Reportergergen Versuche

Die meisten der bekannten DNA-Bindeproteine gehören zu den Transkriptionsfaktoren. Durch Bindung der Transkriptionsfaktoren an Regulatorregionen (Promotor- und Enhancer-Elemente) eines Gens können sie sowohl zu einer Repression als auch zu einer Aktivierung des entsprechenden Zielgens führen. Die funktionelle Analyse eines Transkriptionsfaktors in vivo wird in Gentransfer-Experimenten, so genannten Transfektions-Experimenten durchgeführt. Der zu untersuchende Promotor oder DNA-Abschnitt wird in einen Vektor vor ein Reportergergen inseriert, dessen Expression leicht zu detektieren ist. Der Einfluss des Transkriptionsfaktors auf den Promotor kann somit über die

Expression des im Vektor, direkt hinter dem Promotor, liegende Reportergens gemessen werden. Durch gerichtete Mutationen bzw. Deletionen von DNA-Bindestellen im Promotor kann die Funktion des DNA-Bindeproteins (Transkriptionsfaktors) auf das Zielgen ermittelt werden. In dieser Arbeit wurde Luciferase (123) als Reportergen verwendet. Substrat der Luciferase ist Luciferin. Durch enzymatische Reaktion kommt es zu einer Lichtemission, die im Luminometer gemessen werden kann.

Im Anschluss an die Transfektion der Zellen (siehe 2.9.5) wurde nach 48 bis max. 72 h ein Zellextrakt gewonnen. Die Zellen wurden zuerst mit eiskaltem 1x PBS gewaschen, dann in 350 µl Extraktionspuffer von den Kulturplatten (Durchmesser 6 cm) mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Eppendorfcap überführt. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur und maximaler Geschwindigkeit für 5 min wurde der Überstand in ein neues Eppendorfcap transferiert. Die Proben konnten nach diesem Schritt bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden. Für die Messung im Luminometer wurden 50 µl Zellextrakt mit 185 µl Assay Mix in einem speziellen Reagiergefäß gemischt und automatisch im Luminometer gemessen. Für jeden Zellextrakt wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, aus denen dann ein Mittelwert gebildet wurde. Die Messergebnisse wurden auf den Proteingehalt (siehe 2.15.3.) des jeweiligen Zellextrakts normiert.

<u>Glycylglycin (Gly-Gly)-Puffer:</u>	25 mM Gly-Gly pH 7, 8
	15 mM MgSO_4
	4 mM EGTA pH 7,8
<u>1 mM Luciferin :</u>	5 mg Luciferin
(Lagerung bei -20°C , dunkel)	15,7 ml Gly-Gly-Puffer
	31 µl DTT 1M

Extraktions-Puffer	Assay-Mix	Luciferin-Mix
Gly-Gly-Puffer	150 µl Gly-Gly-Puffer	Gly-Gly-Puffer
1% v/v Triton X-100	30 µl KCl 100 mM	10% Luciferin
1 mM DTT	3 µl DTT 100 mM	
	2 µl ATP 200 mM	
350 µl pro 6 cm Platte	185 µl pro Probe	300 µl Probe

2.10. RNA-Isolation, Reverse Transkription, Polymerase-Kettenreaktion und Auftrennung von DNA-Fragmenten

2.10.1. RNA-Isolation mit TRIzol™ Reagent

Die Isolierung der Gesamt-RNA (mRNA, tRNA und rRNA) aus Zellen erfolgte nach der optimierten Guanidinisothiocyanat/Phenol-Extraktionsmethode (124) mittels TRIzol™ Reagent gemäß Herstellerprotokoll. Vor Lyse der Zellen mittels TRIzol™ Reagent wurden diese einmalig mit eiskaltem 1 X PBS gewaschen. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm Wellenlänge bestimmt. Bei einem A_{OD260}/A_{OD280} – Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 ist die RNA weitestgehend frei von Verunreinigungen durch Proteine. (Siehe 2.13.2.)

2.10.2. DNase I (Desoxyribonuclease I)-Verdau der Ribonukleinsäure

Extrahierte RNA ist mit genomischer DNA kontaminiert, was im Weiteren zu falsch positiven Ergebnissen führen kann. Aus diesem Grund wurde direkt nach der RNA-Extraktion die vorhandene DNA mittels DNase I (Desoxyribonuclease I) enzymatisch degradiert.

DNase I-Verdau:

- 50 µg RNA
- 10 µl human placental RNase Inhibitor (Promega) (1 U/µl)
- 1 µl RNase freie DNase I (Promega) (10 U/µl)
- 5 µl Hepes-Chlorid (0,1 M)
- 5 µl KCl (0,5 M)
- 5 µl MgCl₂ (15 mM)
- H₂O zu einem Endvolumen von 76 µl

Der Ansatz wurde bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Phenol/Chloroform im Verhältnis 3:1 hinzugefügt, gemischt und bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Durch die Zentrifugation erfolgt die Phasentrennung. Die obere Phase enthält die RNA, die in ein neues Eppendorfcap transferiert wurde und mittels 5 µl Natriumacetat (3 M) und 200 µl 100% Ethanol bei -80°C für 30 min gefällt wurde. Nach Zentrifugation mit maximaler Geschwindigkeit bei 4°C für 10 min und Waschen des RNA-Pellets mit 70% Ethanol, wurde das Pellet in 20 µl mit DEPC behandeltem H₂O gelöst und die RNA-Konzentration bestimmt.

2.10.3. Reverse Transkription

Mittels reverser Transkription wurde aus der gesamten RNA der Zellen selektiv die Messenger-RNA, die an ihrem 3'Ende einen Poly-A-Schwanz besitzt, in komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Diese Reaktion wird durch RNA-abhängige DNA-Polymerasen (reverse Transkriptasen) katalysiert und muss, wie bei Polymerasen üblich, durch sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) initiiert werden. Weiterhin werden für diese Reaktion Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP`s) im Überschuss benötigt.

Für die reverse Transkription wurde nach dem Protokoll von Gibco, Life Technologies, Karlsruhe, BRD (SuperScript™ II Reverse Transkriptase) vorgegangen. Von jeder RNA-Probe wurde je ein Ansatz mit reverser

Transkriptase (RT+) durchgeführt. Pro Ansatz wurde eine Negativkontrolle ohne reverse Transkriptase (RT-) mitgeführt, um zu überprüfen, ob im DNase I Verdau die komplette DNA verdaut wurde. Die erhaltene cDNA wurde entweder direkt in der PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

2.10.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) wird ein spezifisches DNA-Fragment zwischen zwei sequenzspezifischen Oligonukleotiden (sense und antisense Primer) durch eine extrem hitzestabile, DNA-abhängige DNA-Polymerase amplifiziert. Um die DNA zu denaturieren, wird der PCR-Ansatz zunächst für 2 min auf 94°C erhitzt, anschließend erfolgt eine zyklische Änderung von drei unterschiedlichen Temperaturen. Diese zyklische Änderung der Temperaturen bewirkt als erstes die Denaturierung der DNA-Matrize, im Folgenden das Anlagern der spezifischen Oligonukleotide (Primer) an homologe Sequenzen der Einzelstrang-DNA (Annealing) und zuletzt die Neusynthese eines komplementären DNA-Stranges an den 3'-OH-Enden der Primer (Extension) durch die Polymerase, die bei 72°C ihr Temperaturoptimum hat. Dieser Temperaturzyklus wird ca. 30 x wiederholt, so dass es zu einer exponentiellen Vermehrung des spezifischen DNA-Fragments kommt. Nach Abschluss der Temperaturzyklen wird der Reaktionsansatz zur Beendigung aller begonnenen Polymerisationen nochmals für 2 min auf 72°C erhitzt. Die Inkubationsschritte der PCR werden in einem programmierbaren Heizblock (Thermalcycler) durchgeführt.

Schritte einer PCR (Schritte 2 bis 4 werden ca. 30x wiederholt):

Schritt	Vorgang	Temp.	Zeitdauer
1	Denaturierung der DNA	94°C	2 min
2	Denaturierung der DNA	94°C	0,5-1 min, je nach Fragmentlänge
3	Annealing der Primer	T _m	0,5-1 min, je nach Fragmentlänge
4	Elongation der DNA	72°C	30 sec pro 500 bp
5	Elongation de DNA	72°C	2 min

Die T_m (Schmelztemperatur des Primers) berechnet sich aus der Länge und dem GC-Gehalt des Oligonukleotides nach folgender Formel und wird normalerweise vom Hersteller angegeben:

$$T_m = 69,3 + 0,4 \times (\% \text{ GC-Gehalt}) - 650/\text{Länge des Primers in bp}$$

PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase (TaKaRa Ex Taq™):

- 5 µl 10x Ex-Taq™-Puffer
- 4 µl dNTP Mix (je 2,5 mM)
- 2 µl DNA-Template
- 1 µl „sense“-Primer
- 1 µl „antisense“-Primer
- 1 µl Ex Taq™-Polymerase (5 U/µl)
- H₂O zu einem Endvolumen von 50 µl

2.10.5. Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte durch ein Agarosegel, da niedermolekulare DNA schneller von der Kathode zur Anode wandert. Je nach Größe der Fragmente wurden 1,2 – 2,0%-ige Gele verwendet. Zur Auftrennung niedermolekularer Fragmente wurden Gele mit höherer Agarosekonzentration benötigt und umgekehrt.

Für 1,2%-ige Gele wird 1,2 g Agarose mit 100 ml 1 x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und nach Abkühlen der Lösung auf 50°C mit 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt. Nach Polymerisation des Agarosegels wurde der Gelschlitten in eine mit 1 x TAE-Puffer (als Laufpuffer) gefüllte Elektrophoresekammer gelegt, die DNA-Proben (0,5-1,0 µg pro Bahn) wurden mit 1 X DNA-Loading Buffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Anhand eines zusätzlich geladenen DNA-Größenstandardmarkers konnten die Fragmentgrößen der aufgetrennten DNA abgeschätzt werden. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt für 1 h. Das Gel wurde unter UV-Licht betrachtet, fotografiert und digitalisiert.

50 x TAE-Puffer: 242 g Tris-Cl
57,1 ml Eisessig
100 ml EDTA 0,5M pH 8,0
ad 1 Liter H₂O

Loading Buffer für DNA-Agarose-Gele: 30% Glycerol
0,1M EDTA pH 8, 0
1% SDS
0, 25% Bromphenolblau
0,25% Xylencyanol
H₂O

2.10.6. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die entsprechenden DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorfcap überführt. Die in den Gelstücken enthaltene DNA wurde mit Hilfe des *QIAquick Gel-Extraktions-Kit* laut Herstellerprotokoll eluiert, anschließend in 15 µl sterilem H₂O aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

2.11. DNA-Sequenzierung

2.11.1. Sequenzierungs-PCR

Bei einer Sequenzierungs-PCR werden neben den normalen auch fluoreszierende Nukleotide in die DNA-Ketten eingebaut. Jedes der vier verschiedenen fluoreszierenden Nukleotide emittiert Licht mit charakteristischer Wellenlänge. Nach Einbau der 3'-fluoreszenzmarkierten ddNTP's kommt es zu einem Strangabbruch. Die Verteilung der fluoreszenzmarkierten Nukleotide geschieht zufällig, sodass am Ende DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge vorliegen, die elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Sequenzierungs-PCR:

- 200-500 ng DNA
- 1 µl Primer (c=3,3 pmol)
- 4 µl Big Dye Mix
- H₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 20 µl.

Im Big Dye Mix sind die Desoxyribonukleotide (dNTP's), die fluoreszierenden Nukleotide (ddNTP's) sowie Polymerase und Puffer enthalten.

Zyklusbedingungen der Sequenzierungs-PCR (Schritte 2-4 wurden 25 x wiederholt):

Schritt	Vorgang	Temperatur	Zeitdauer
1	Denaturierung der DNA	94°C	5 min
2	Denaturierung der DNA	94°C	30 sec
3	Annealing der Primer	50°C	15 sec
4	Elongation der DNA	60°C	5 min

2.11.2. Aufreinigung und Fällung der Proben

Die PCR-Proben wurden anschließend gemäß dem Protokoll *AutoSeqTM G-50* aufgereinigt. Durch die Harzsäulchen wurde der Überschuss an fluoreszenzmarkierten Dideoxynukleotiden (ddNTP`s), die nicht in die DNA-Ketten eingebaut waren, herausgefiltert. Nach der Aufreinigung wurde die DNA mit Isopropanol gefällt. Das erhaltene Pelett wurde in 25 µl TSR resuspendiert und in die speziellen 0,5 ml Röhrchen überführt. Vor der Sequenzierung wurden die Proben 2 min bei 94°C aufgeköcht und dann auf Eis gestellt.

2.11.3. Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde am automatischen Sequenzierer ABI310 (Perkin Elmer) durchgeführt. Es erfolgt eine elektrophoretische Auftrennung der unterschiedlichen DNA-Fragmente nach ihrer Größe. Beim Durchtritt des sich am Ende des DNA-Stranges befindenden fluoreszierenden Nukleotids durch die Kapillare wird es mit einem Laser bestrahlt und kann anhand seiner charakteristischen Fluoreszenz der entsprechenden Base zugeordnet werden. Es können mit dieser Methode Sequenzanalysen bis zu 450 bp durchgeführt werden. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm DNASTAR.

2.12. Bakterien

2.12.1. Herstellung ultrakompetenter Bakterien

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurden die *Escherichia coli* Stämme JM109 und DH5 α verwendet. Die Bakterien wurden nach dem Protokoll von Inoue (125) mit einem Calciumchlorid enthaltenden Puffer (TB-Puffer) ultrakompetent gemacht, d.h. sie wurden dazu gebracht, Plasmid-DNA aus dem umgebenden

Medium aufzunehmen und zu amplifizieren. 250 ml SOB-Medium wurde mit einer JM109 bzw. DH5 α Übernachtskultur beimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 in einem Rotationsschüttler inkubiert (ca. 3-4 h). Die Kultur wurde 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend 10 min bei 2500 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend wieder 10 min bei 2500 x g und 4°C abzentrifugiert. Die Bakterien wurden in 20 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen und unter leichtem Schwenken wurde DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% (1,4 ml) zugegeben, 10 min auf Eis inkubiert, aliquotiert und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

TB (Transformations-Puffer):

- 10 mM Pipes
- 55 mM MnCl₂
- 15 mM CaCl₂
- 250 mM KCl
- pH 6,7 –7,0

SOB-Medium:

- 2% (w/v) Bacto tryptone
- 0,5% (w/v) Yeast extract
- 10 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄
- pH 6,7 (5N KOH oder MnCl₂)

2.12.2. Transformation mittels Hitzeschock

100 μ l ultrakompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 μ l (ca. 50 μ g) Ligationsansatz auf Eis gemischt. Der Reaktionsansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend exakt auf 42°C für 90 sec erhitzt. Dieser Ansatz

wurde danach nochmals 2 min auf Eis gestellt, mit 500 µl SOC-Medium versetzt und für 30 min bei 37°C horizontal geschüttelt. Durch Inkubation mit SOC-Medium, das keine Antibiotikazusätze enthält, können die Bakterien die auf dem Plasmid enthaltenen Antibiotikaresistenz entwickeln. Anschließend wurden 250 µl des Ansatzes auf Selektions-LB-Agarplatten je nach Antibiotikaresistenz (die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide enthielten ausschließlich ein Ampicillin-Resistenzgen) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine Kolonie der transformierten Bakterien gepickt und 10 ml antibiotikahaltiges (Ampicillin) LB-Medium beimpft. Durch Inkubation bei 37°C über Nacht in einem Schüttler vermehrten sich die Bakterien exponentiell und mittels DNA-Präparation (siehe 2.12.) konnten die Plasmide aus den Bakterien isoliert werden.

SOC-Medium: Zusammensetzung wie SOB-Medium,
zusätzlich 50 mM Glucose

LB-Medium: 1% (w/v) Bacto tryptone
0,5% (w/v) Yeast extract
200 mM NaCl

LB-Agarplatten: LB-Medium
0,7% (w/v) Agarose

Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml in H₂O gelöst
Endkonzentration im Medium 100 µg/ml

2.12.3. Glyceroldauerkulturen

Um transformierte Bakterien über längere Zeit aufzubewahren, wurden sie in glycerolhaltigem Medium bei -80°C gelagert. 800 µl einer frischen

Bakterienübernachtskultur und 800 µl Glycerol wurden durch vortexen gemischt und in Cryo Vials bei -80°C gelagert.

2.13. DNA-Isolierung

2.13.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien wurde der *RPM-Mini-Prep* der Firma *BIO 101* und für größere Plasmidmengen der *Rapid-Pure-Mini-Monsterprep (RPM 4G)* der Firma *BIO 101* verwendet. Hierbei wird zunächst eine alkalische Lyse der Bakterien und anschließend eine Glasmilch Aufreinigung durchgeführt. Aus einer Bakterienübernachtskultur wurde die Plasmid-DNA gemäß Herstellerprotokoll isoliert. Das am Schluss erhaltene Pellet wurde in 50 µl bzw. 200-500 µl sterilem H_2O aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

2.13.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäureproben

Die Konzentrationsbestimmung der DNA und auch der RNA erfolgte durch photometrische Bestimmung der optischen Dichte in einem Spektralphotometer mit einer Xenonlampe als Lichtquelle. Die optische Dichte der Probe wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Als Referenz- bzw. Leerwert diente H_2O bzw. das jeweilige Lösungsmittel.

Der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ wird als *Ratio* bezeichnet und erlaubt eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäureprobe. Für DNA sollte die Ratio zwischen 1,6 und 2,0 liegen. Bei Verunreinigungen durch Protein oder organische Lösungsmittel ist die *Ratio* erniedrigt.

Über die Messung der OD_{260} kann die Konzentration der Nukleinsäure in der Probe berechnet werden. Eine optische Dichte bei 260 nm von 1 entspricht bei

doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, bei einzelsträngiger DNA und RNA 40 µg/ml und bei einzelsträngigen Oligonukleotiden 20 µg/ml.

Die Berechnung der Konzentration erfolgt nach folgender Formel:

$$C \text{ mg/}\mu\text{l} = (\text{OD}_{260} \times 50_{\text{dsDNA}}/40_{\text{ssDNA,RNA}}/20_{\text{ssOligo}}) \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.14. Methoden zur Herstellung von Expressionsplasmiden und Vektoren

2.14.1. DNA-Verdau mit Restriktionsenzymen

Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure kann durch Restriktionsenzyme spezifisch gespalten werden, so dass linearisierte DNA entsteht. Die Restriktionsenzyme erkennen bestimmte, für sie spezifische DNA-Sequenzen und schneiden die DNA an dieser Stelle. Für einen Restriktionsverdau wurden 5-10 µl DNA (1-5 µg), 2 µl BSA (1 mg/ml), 2 µl enzymespezifischer Puffer (10 X), 1 µl Restriktionsenzym (10 U/µl), und H₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt. Der Ansatz wurde je nach spezifischer Inkubationstemperatur und -zeit des Enzyms inkubiert. Die Vollständigkeit des Verdau wurde mittels elektrophoretischer Auftrennung durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.14.2. Ligation mit der Gibco-T₄-DNA-Ligase

Linearisierte „Insert“-DNA und linearisierte „Vektor“-DNA wurde durch das Enzym T₄-DNA-Ligase verbunden. In dieser Arbeit war es immer leicht möglich, da sowohl Insert als auch Vektor mit demselben Enzym geschnitten wurden. Das Verhältnis Vektor zu Insert trägt wesentlich zum Erfolg der Ligation bei. Optimal wäre ein Verhältnis 1:1. Für einen 10 µl Ansatz wurde ein Verhältnis von 1 µl „Vektor“-DNA zu 2-6 µl „insert“-DNA gewählt. Als Negativkontrolle

diente ein Ansatz ohne Insert-DNA. Jedem Ansatz wurde noch 1 µl T₄-DNA-Ligasepuffer sowie 2 µl T₄-DNA-Ligase und H₂O bis zu einem Volumen von 10 µl zugegeben. Er wurde über Nacht bei 16° C inkubiert und am nächsten Morgen nochmals für 4 Stunden bei 25°C. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde anschließend direkt in der Transformation eingesetzt.

2.14.3. Ligation mit dem TOPOTMTA Cloning Kit

Zur direkten Klonierung der durch *Taq*-DNA-Polymerase generierten PCR-Fragmente in Plasmidvektoren wurde der *TOPOTMTA Cloning Kit* der Firma *Invitrogen* verwendet. Die *Taq*-DNA-Polymerase besitzt eine Transferaseaktivität, die an das 3'-Ende der PCR-Produkte einen Deoxyadenosinrest (A) bindet. Der in dem Kit enthaltene linearisierte Vektor (pCR[®]2.1-TOPO) besitzt am 3'-Ende einen Deoxythymidinrest (T). Somit kann das „PCR-Insert“ sehr gut mit dem Vektor ligiert werden. Katalysiert wird diese Ligation durch das Enzym Topoisomerase I, das an den im Kit enthaltenen Vektor kovalent gebunden ist.

Laut Anleitung wurde 1 µl Vektor-DNA (pCR[®]2.1-TOPO) mit 0.5-4 µl PCR-Produkt und H₂O bis zu einem Volumen von 5 µl versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die erhaltene Plasmid-DNA konnte direkt in der Hitzeschocktransformation eingesetzt werden. Hierfür wurden die mit dem Kit gelieferten kompetenten Bakterien (TOP10 One ShotTM cells) verwendet.

2.14.4. QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit

Mit Hilfe des auf PCR basierenden *QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kits* von *Stratagene* können gezielt Punktmutationen, Deletionen oder zusätzliche Basen in eine bekannte DNA-Sequenz eines Plasmids eingefügt werden.

In dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um die bekannte STAT-Bindungsstelle des –410 bp langen Ratten-Insulingenpromotors 1 zu mutieren, also um Punktmutationen einzubringen. Hierfür wurden spezifische Primer generiert (mINSTAT-2 und mINSTAT-B, siehe Abschnitt 2.7). Die gewünschte Mutation lag in der Mitte der Primer. Anfang und Ende der Primer stimmten bis zu 15 Basenpaaren mit der „Elternsequenz“ überein. In der PCR wurde mit der PfuTurbo™ DNA Polymerase das komplette Plasmid amplifiziert und die Mutation eingebracht. Durch die *DpnI* Endonuklease, die spezifisch für methylierte und hemimethylierte DNA ist, wurde die „Eltern“-DNA verdaut, da fast jede von *E.coli* isolierte DNA methyliert ist. Somit war die neu synthetisierte DNA selektioniert. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde anschließend direkt für die Transformation eingesetzt.

Die Durchführung erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll.

2.15. Herstellung spezifischer Expressionsplasmide und Vektoren

2.15.1. Herstellung des Expressionsplasmides rSTAT3pcDNA3.1-

Aus cDNA von INS-1 Zellen wurde zunächst mittels spezifischer PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase (siehe 2.10.4.; Primer siehe 2.7.; Annealing Temperatur 68°C; 30 Zyklen) die STAT3 „coding sequence“ amplifiziert, auf ein Agarosegel aufgetragen und aus dem Gel eluiert. Das erhaltene ca. 2300 bp lange PCR-Fragment wurde mit Hilfe des *TOPO™TA Cloning Kit* direkt in den pCR®2.1-TOPO Vektor kloniert. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Sequenzierung überprüft. Das neu erhaltene Plasmid erhielt den Namen rSTAT3pCR®2.1-TOPO.

Da der pCR®2.1-TOPO Vektor für die Überexpression in Zellen ungeeignet war, wurde die STAT3 cds (coding sequence) mit *Bam*HI und *Xho*I ausgeschnitten. Das endgültige Plasmid pcDNA3.1- wurde ebenfalls mit *Bam*HI und *Xho*I linearisiert. Insert (STAT3 cds) und linearisiertes Plasmid (pcDNA3.1-) wurden durch das Enzym T₄-DNA-Ligase wieder verbunden, anschließend mittels

Hitzeschock in Bakterien transformiert und mit *Mini-* und *Mini-Monsterprep* vermehrt. Die Richtigkeit des Plasmids wurde durch einen differentiellen Verdau mit *Bam*HI und *Nae*I sowie durch Sequenzierung überprüft. Seine Fähigkeit zur Überexpression wurde in Western Blot Analysen überprüft, nachdem es in COS-7 Zellen, die selbst kein STAT3 exprimieren, transient transfiziert wurde.

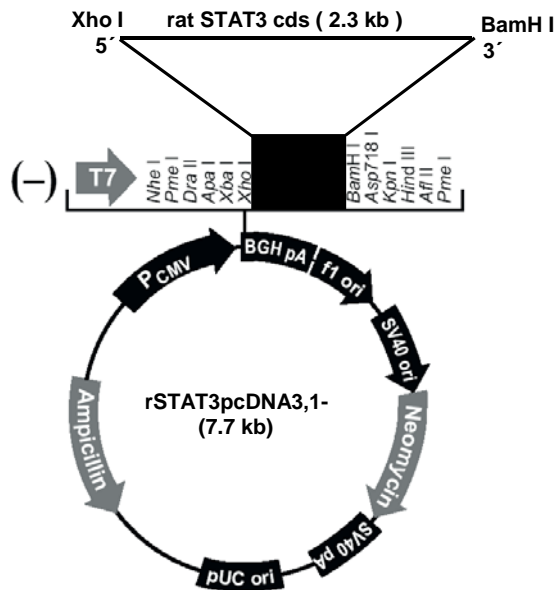


Abb. 2.8.: rSTAT3pcDNA3.1-. Eukaryotisches Expressionsplasmid zur Expression von STAT3 der Ratte.

2.15.2. Herstellung des Luciferase-Reporter-Gen-Vektors -410rINS-1mutSTATpGI3

Um den Einfluss der STAT-Transkriptionsfaktoren auf den -410 bp langen Ratten-Insulingenpromotor 1 näher zu untersuchen, wurde ein Luciferase-Reporter-Gen-Vektor hergestellt, in dem die bekannte STAT-Bindungsstelle mutiert war. Dies erfolgte mit Hilfe des *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits* (2.12.4.). Die Primer (mINSTAT-2 und mINSTAT-B) sind unter 2.7. angegeben. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Sequenzierung überprüft.

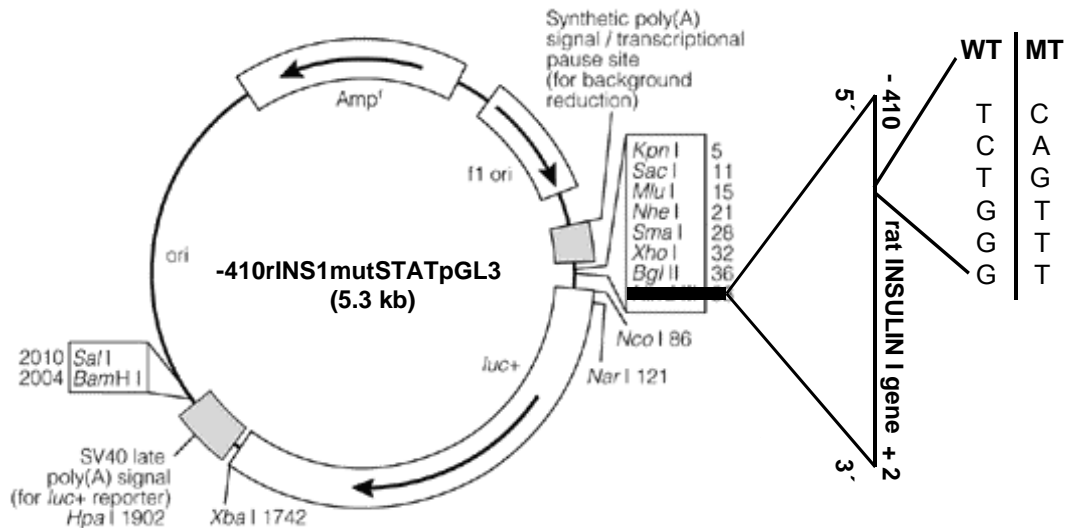


Abb. 2.9.: -410rINS1mutSTATpGL3. Dieser Vektor enthält den 410 bp langen Insulingenpromotor 1 mit der mutierten STAT-Bindungsstelle. (WT-Wildtyp; MT-mutierter Typ)

2.15.3. Herstellung der Deletionskonstrukte des Ratten-Insulingenpromotors1

Im -410 bp langen Ratten-Insulingenpromotor 1 sind außer dem STAT-Element noch weitere DNA-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren bekannt, die für die Aktivierung des Promotors eine Rolle spielen. Um dies zu untersuchen wurden 5'-Deletionskonstrukte des -410rINS-1 Promotors hergestellt, bei denen die bekannten Bindungsstellen systematisch am 5'-Ende deletiert wurden.

Die entsprechenden „sense“-Primer (rINSp 1-5, siehe 2.7. und Tabelle1) wurden anhand der Basensequenz des -410rINS-1pGL3 Promotors und der bekannten DNA-Bindungsstellen für die verschiedenen Transkriptionsfaktoren kreiert. Schematisch ist dies in Abbildung 2.10. dargestellt. Als „antisense“-Primer diente pGL2A.S.. Es wurde eine PCR mit der Taq-DNA-Polymerase durchgeführt (siehe 2.10.4.), die Annealing Temperatur lag bei 55°C. Die Zyklen wurden 36 x wiederholt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit *NcoI* am 3'-Ende geschnitten, auf ein 2% Agarosegel aufgetragen und extrahiert. Der Vektor pGL3 wurde mit *NcoI* und *SmaI*

aufgeschnitten, auf ein 1,2%-iges Gel geladen und ebenfalls extrahiert. Durch die T4-DNA-Ligase wurden Insert und Vector ligiert, in Bakterien transformiert und mittels *Mini-* und *Mini-Monsterprep* vermehrt. Die Richtigkeit der Plasmide wurde durch Sequenzierung überprüft.

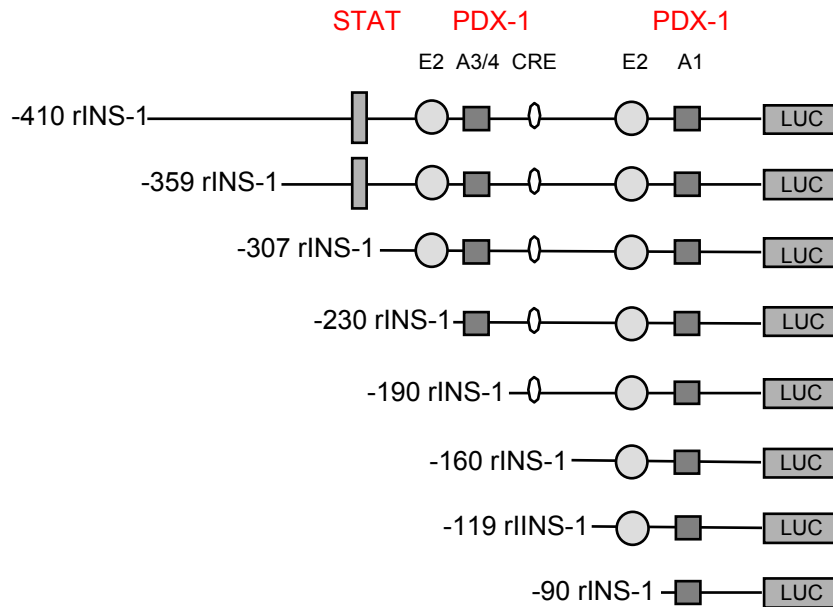


Abb. 2.10.: -410rINS1pGL3 und Deletionskonstrukte. Dargestellt sind die verschiedenen DNA-Bindungs-elemente sowie die Lage der ausgewählten Primer rINSp-1-5 zur Herstellung der 5'-Deletionskonstrukte des -410rINS-1pGL3-Vektors.

Tabelle1: Lokalisation der DNA-Bindungs-elemente im 410bp langen Ratten-Insulingenpromotor 1, sowie Lokalisation der entsprechend ausgesuchten Primer und daraus resultierenden Vektoren.

DNA-Bindungs-element	Primer	Resultierender Vektor
Krypt. STAT -365 bis -372 bp	rINSp-1 -337 bis -359 bp	-359rINS1pGL3
STAT -325 bis -332 bp		-307rINS1pGL3
E2 -231 bis -241 bp	rINSp-2 -204 bis -230 bp	-230rINS1pGL3
A3/A4 -196 bis -227 bp	rINSp-3 -165 bis -190 bp	-190rINS1pGL3
CRE -175 bis -185 bp		-160rINS1pGL3
E1 -104 bis -112 bp	rINSp-4 -93 bis -119 bp	-119rINS1pGL3
A1 -64 bis -85 bp	rINSp-5 -68 bis -90 bp	-90rINS1pGL3

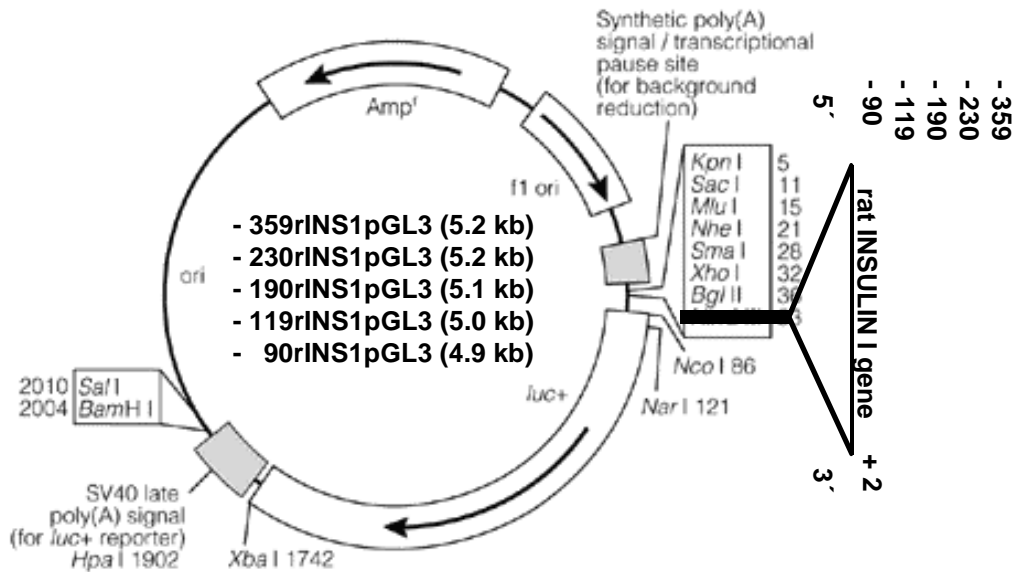


Abb. 2.11 -359rINS1pGL3, -230rINS1pGL3, -190rINS1pGL3, -119rINS1pGL3, -90rINS1pGL3. Sie enthalten den 359, 230, 190, 119 bzw. den 90 bp langen Ratten-Insulingenpromotor 1.

2.15.4 Herstellung des Luciferase-Reportergen-Vektors -1054rSOCS3pGI3

Anhand der bekannten Gensequenz für SOCS3 der Ratte wurden Primer (rSOCS3-3 und rSOCS3-C, Abschnitt 2.7) zur Vermehrung der rSOCS3 Promotor-DNA ausgesucht. Das durch PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase (siehe 2.10.4.; Annealing Temperatur 67°C; 35 Zyklen) erhaltene, ca. 1276bp lange PCR-Produkt wurde auf ein 1,2%-iges Agarosegel geladen und eluiert. Es folgte anschließend die direkte Klonierung in den pCR[®]2.1-TOPO Vektor mittels *TOPO[™]TA Cloning Kit*, so dass das Plasmid -1054rSOCS3pCR[®]2.1-TOPO entstand. Aus diesem Plasmid wurde mit *SacI* und *XhoI* die SOCS3-Promotor-DNA ausgeschnitten. Der Luciferase-Vektor pGI3basic wurde ebenfalls mit *SacI* und *XhoI* aufgeschnitten. Beide Proben wurden auf ein 1,2%-iges Agarosegel geladen, die SOCS3-Promotor-DNA bei ca.1400 bp, der linearisierte Vektor pGI3 bei ca.4800 bp ausgeschnitten und aus dem Gel

extrahiert. Insert (SOCS3-Promotor-DNA) und Vektor (pGI3) wurden durch die T4-DNA-Ligase verbunden, sodass der Luciferase-Reporter-gen-Vektor -1054rSOCS3pGI3 entstand. Es folgte eine Sequenzierung der Insertionsenden zur Überprüfung der Klonierung.

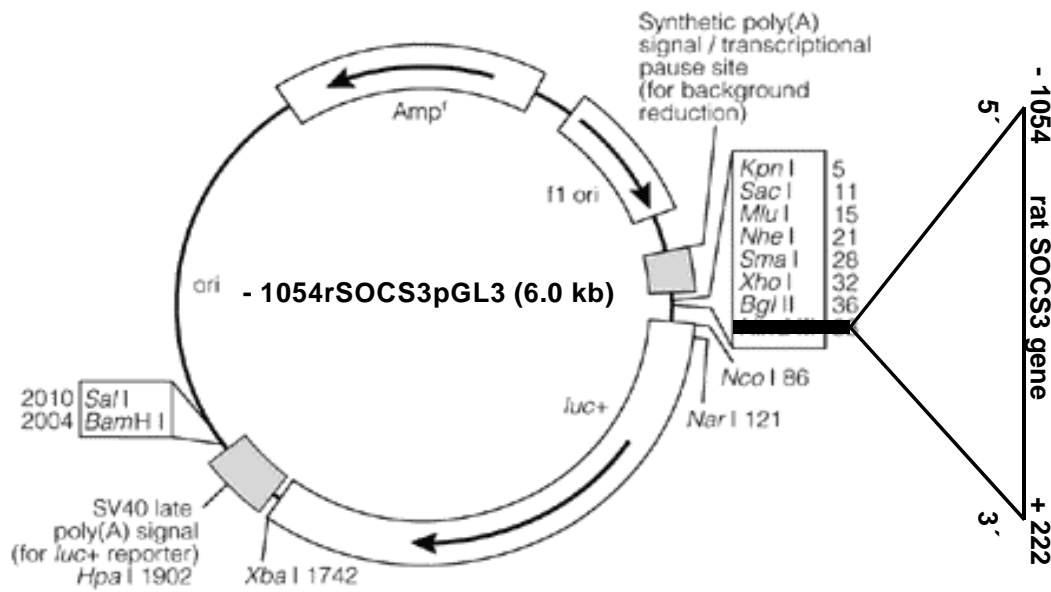


Abb. 2.12–1054rSOCS3pGL3. Dieser Vektor enthält den 1054bp langen SOCS3-Promotor der Ratte.

2.15.5. Herstellung des Expressionsplasmids rSOCS3pcDNA3.1+

Die SOCS3 coding sequence (cds) wurde mittels PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase (siehe 2.10.4.) mit spezifischen Primern (rSOCS3-2 und rSOCS3-B; Annealing Temperatur 67°C; 35 Zyklen) amplifiziert, auf ein 1,2%-iges Agarosegel aufgetragen und extrahiert. Das auf diesem Weg erhaltene gelaufgereinigte PCR-Produkt wurde mit Hilfe des *TOPO™TA Cloning Kit* direkt in den pCR®2.1-TOPO Vektor kloniert. Das Plasmid erhielt den Namen rSOCS-CDS-pCR®2.1TOPO. Die 699 bp lange rSOCS3 coding sequence wurde durch einen Verdau mit *Bam*HI und *Xho*I aus dem pCR®2.1-TOPO geschnitten. Das Plasmid pcDNA3.1+ wurde ebenfalls mit *Bam*HI und *Xho*I aufgeschnitten. Beide

Proben wurden auf ein Gel geladen und aus dem Gel extrahiert. Durch Ligation mit der T4-DNA-Ligase entstand das Plasmid rSOCS3pcDNA3.1+, welches teilsequenziert wurde.

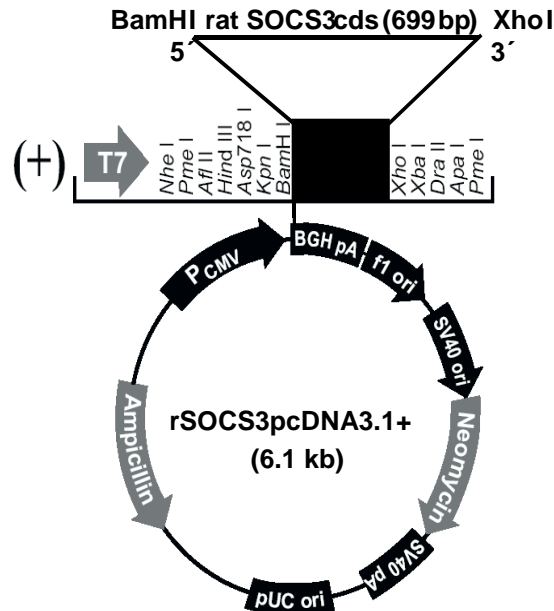


Abb. 2.12.: rSOCS3pcDNA3.1+. Dieses Plasmid enthält die kodierende Sequenz für SOCS3 der Ratte.

2.16. Proteinchemische Methoden

2.16.1. Herstellung von Ganzzellextrakten (Whole Cell Extracts; WCE)

Um Proteine untersuchen zu können, wurde ein Ganzzellextrakt hergestellt. Hierbei wurden die Zellen durch einen Lysispuffer aufgebrochen und die Proteine von größeren unlöslichen Zellbestandteilen und Zellmembranbestandteilen (z.B. Lipide) durch Zentrifugation getrennt.

Hierfür wurden die Zellen zunächst mit eiskaltem 1 X PBS gewaschen, anschließend wurde 800 µl RIPA-Puffer auf die Zellen gegeben, bevor sie mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgekratzt wurden. Die Zellsuspension wurde in Eppendorfcaps überführt und nach einer Inkubationszeit von 5 min auf Eis wurde sie für 15 min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

Der Überstand mit den darin enthaltenen Proteinen wurde in ein neues Eppendorfcap transferiert und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

RIPA-Puffer: 150 mM NaCl
 5 mM NaF
 20 mM Tris pH 7,5
 1 mM EDTA pH 8,0
 1% NP-40
 1% DOC
 0,1% SDS
 H₂O zu einem Endvolumen von 100 ml

Kurz vor Gebrauch Proteinaseinhibitor 1 mM DTT und 1 mM PMSF supplementieren. Lagerung des Puffers bei 4°C .

2.16.2. Herstellung von Kernextrakten (Nuclear Extracts)

Um im Kern exprimierte Proteine untersuchen zu können, wurden Kernextrakte (126) hergestellt.

Die Zellen wurden zuerst mit eiskaltem 1 X PBS gewaschen und dann mit 1 ml 1 x PBS von den Zellkulturschalen mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Eppendorfcap überführt. Nach Zentrifugation bei $1200 \times g$ für 2 min wurde das Pellet in 1 x PBS resuspendiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, bevor das Pellet in 400 μl eiskaltem Lysispuffer (Puffer A) resuspendiert und auf Eis inkubiert wurde. Diese Inkubationszeit ist für jede Zelllinie verschieden und beträgt für die Zelllinie INS-1 ca. 15 min. Es wurde nun 25 ml 1% NP-40 (IGEPAL) dazugegeben und durch Vortexen gemischt, bis die Zellmembranen zerstört und die Zellkerne isoliert waren. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min und 4°C pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 50 μl eiskaltem Extraktionspuffer (Puffer C)

resuspendiert und für 15 min bei 4°C unter ständigem Vortexen inkubiert, so dass die Kernproteine extrahiert wurden. Anschließend wurde nochmals bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand, der die Kernextrakte enthielt, in ein neues Reagiergefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt.

Puffer A (hypoton)	Puffer C (hyperton)
10 mM HEPES pH 7,9	20 mM HEPES pH 7,9
10 mM KCl	0,4 M NaCl
0,1 mM EDTA pH 8,0	1 mM EDTA pH 8,0
0,1 mM EGTA pH 8,0	0,1 mM EGTA pH 8,0
H ₂ O ad 100 ml	20 % Glycerol
	H ₂ O ad 100 ml

1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 Tablette Proteinaseinhibitor pro Lösung dazugeben und bei 4°C lagern

2.16.3. Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford

Die Proteinmenge einer Lösung wurde spektrometrisch mit dem *BIO RAD* Protein Assay, in Anlehnung an die Proteinbestimmung nach Bradford (127) gemäß Angaben des Herstellers, bestimmt. Es wurde eine Standardkurve bei 595 nm mit BSA (in den Konzentrationen: 0,625 µg/µl, 1,25 µg/µl, 2,5 µg/µl, 5 µg/µl, 10 µg/µl) und dem jeweiligen Lösungspuffer erstellt. Anhand der Standard- bzw. Eichkurve wurden die Proteinkonzentrationen berechnet. Die Messung erfolgte in einem Mikrotiter[®]-Platten-Photometer.

2.16.4. Immunpräzipitation mittels Protein-A-Sepharose

Um Proteininteraktion bzw. Komplexbildung zwischen zwei oder mehr Proteinen nachzuweisen, wurden Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. 100 µg Kernextrakt wurde zunächst auf eine Salzkonzentration (NaCl-Konzentration) von 200 mM mit ELB ohne Salz verdünnt (Puffer C für Kernextrakte enthält eine NaCl-Konzentration von 400 mM), auf ein Volumen von 500 µl mit ELB mit Salz aufgefüllt und 20 µl Protein-A-Sepharose dazugegeben. Der Ansatz wurde 15 min bei 4°C in einem Rotationsschüttler inkubiert und anschließend für 5 min bei 1000 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfcap überführt. Das verworfene Pellet enthielt die Sepharose und die daran gebundenen unspezifischen Antikörper, die im Kernextrakt enthalten waren und die Immunpräzipitation stören würden. Der gegen das zu präzipitierende Protein spezifische Antikörper (STAT3-, STAT5b- und JAK2-Antikörper in einer Verdünnung von 1:500; Anti-Phosphotyrosin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000), wurde in der gewünschten Konzentration in den Überstand gegeben und über Nacht bei 4° C in einem Rotationsschüttler inkubiert. Es konnten sich nun Protein-Antikörperkomplexe bilden. Als nächstes wurden 100 µl Protein-A-Sepharose dazugegeben, für 1 Stunde bei 4° C inkubiert und danach bei 1000 rpm und 4° C für 5 min zentrifugiert. Der Protein-Antikörperkomplex war nun an die Protein-A-Sepharose gebunden. Der Überstand wurde verworfen und Protein-A-Sepharose Kügelchen in 500 µl ELB mit Salz resuspendiert, 5 min im Rotationsschüttler bei 4°C inkubiert und wieder abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde 3 x wiederholt. Am Schluss wurden die Protein-A-Sepharose Kügelchen in 20 µl SDS-PAGE-Probenpuffer (Laemmli-Proben-Puffer) resuspendiert, das immunpräzipitierte Protein wird durch den Proben-Puffer von den Kügelchen abgelöst und liegt somit gelöst im Proben-Puffer vor. Bevor die Proben auf das Gel geladen werden konnten, mussten sie denaturiert (siehe 2.16.5.) und abzentrifugiert werden.

<u>ELB-Puffer:</u>	NaCl	100 mM (bei ELB mit NaCl)
	NP-40	0,1 %
	EDTA	5 mM
	HEPES	50 mM
	PMSF	1 mM
	DTT	0,5 mM
	Proteinaseinhibitor	
	H ₂ O	ad 100 ml

2.16.5. Western Blot

Der Western Blot dient dem Nachweis von Proteinen. Die in Ganzzell- und Kernextrakten enthaltenen Proteine werden durch denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt, auf PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid) übertragen (Blotting) und dann mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Der Antikörper-Antigen-Komplex wird durch Zugabe eines sekundären Antikörpers sichtbar gemacht. Dieser ist an ein Enzym (HRP, horseradish-peroxidase) gekoppelt, das ein Substrat (ECL-Reagenz) zur Lichtemission anregt (Chemilumineszenzreaktion).

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE):

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels Vertikalgelelektrophorese in einem SDS-Polyacrylamidgel, wurden Trenngel zwischen 5 und 12% Polyacrylamidgehalt und einem pH von 8,8 verwendet. Vor Auftrennung im Trenngel wurden die Proteine zur Erhöhung der Auflösung in einem 4,5% Sammelgel mit einem pH von 6,8 auf eine schmale Startzone konzentriert. Die gewählte Prozentigkeit des Trenngels richtete sich nach der Größe des nachzuweisenden Proteins. Je kleiner das Protein war, desto höherprozentig wurde das Trenngel gewählt. Trenn- und Sammelgel wurden zwischen zwei fettfreie Glasplatten in einen Gießstand einer BIO RAD Proteingel-Kammer gegossen.

Acrylamidgel:	Trenngel (z.B. 12%)	Sammelgel (4,5%)
30% Polyacrylamid	4 ml	750 µl
1,5 M Tris-Cl (pH 8,8)	2,5 ml	---
0,5 m Tris-Cl (pH 6,8)	---	1,25 ml
10% SDS	100 µl	50 µl
Temed	6 µl	3 µl
40% Ammoniumpersulfat	15 µl	7,5 µl
H ₂ O	ad 10 ml	ad 5 ml

Nach Polymerisation des Trenn- und Sammelgels, wurde das Gel in die Gel-Elektrophoresekammer (BIO RAD) eingespannt und diese mit Tank-Puffer befüllt.

Die Proteinproben (Kern- bzw. Ganzzellextrakte) wurden in 1 x SDS-PAGE-Probenpuffer für 3 min bei 97° C hitzedenaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde noch ein Proteinstandard der Firma Sigma mit aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte bei kleinen Gelen stromkonstant bei 15 mA pro Gel für ca. 1 h, bis die Bromphenolblaufront das untere Ende des Gels erreicht hatte, wobei die SDS-komplexierten Proteine negativ geladen sind und zur Anode wandern.

<u>10x Tank-Puffer (Elektrophorese-Puffer):</u>	Tris-Base	30 g
	Glycin	144 g
	10% SDS	100 ml
	H ₂ O	ad 1 l

<u>SDS-PAGE-Probenpuffer:</u>	4% SDS	20 ml
	100 mM Tris-Cl pH 6,8	5 ml
	20% Glycerol	10 ml
	8 M Urea	24 g
	Bromphenolblau nach Wunsch	

Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran:

Unmittelbar nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der getrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Protein-bindende Polyvinylidendifluorid-Membran. Der Transfer erfolgte senkrecht zu Trennrichtung, damit das Muster der getrennten Proteine auf der Membran dem Trennmuster des Gels entspricht. Hierfür wurde ein halbtrockenes Verfahren (Semi-Dry-Blot) mit Grafitplatten in der Blotvorrichtung verwendet. Der Semi-Dry-Blot wurde luftblasenfrei aufgebaut: Grafitplatte der Anodenseite, 2 mit A1-Puffer getränkte Filterpapiere, 1 mit A2-Puffer getränktes Filterpapier, PVDF-Membran (sie wurde zunächst in Methanol, dann in H₂O und anschließend in A2-Puffer geschwenkt), Gel, 3 mit CAPS-Puffer getränkte Filterpapiere, Grafitplatte der Kathode. Es wurde eine Spannung angelegt und die Proteine wurden für 2 h stromkonstant bei 0,8 mA pro cm² Gelfläche auf die Nitrozellulose-Membran transferiert (geblottet).

Anodenpuffer 1 (A1-Puffer)	Anodenpuffer 2 (A2-Puffer)	Kathodenpuffer (CAPS-Puffer)
0,3 M Tris-Base	25 mM Tris-Base	70 mM CAPS
20% Methanol	20% Methanol	20% Methanol
H ₂ O ad 1 l	H ₂ O ad 1 l	H ₂ O ad 1 l

Immunodetektion der Proteine:

Die auf die PVDF-Membran fixierten Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und sichtbar gemacht. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die PVDF-Membran zu verhindern, wurde die Membran zuerst für mindestens 1 h in Blocking-Puffer inkubiert, um überschüssige Proteinbindestellen der Membran abzusättigen. Zuvor wurde die Membran jedoch getrocknet, um Verluste an geblottetem Protein durch die Blocking-Reaktion zu reduzieren. Nach der Absättigung wurde die Membran kurz durch den Wasch-Puffer gezogen und mit dem ersten Antikörper (STAT3-, STAT5b- und JAK2-Antikörper in einer Verdünnung von 1:500; Anti-Phosphotyrosin-

Anitkörper in einer Verdünnung von 1:1000), verdünnt in der gewünschten Konzentration mit Wasch-Puffer, für 1-2 h auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran 2 x 15 min in Waschpuffer gewaschen, bevor mit dem sekundären Antikörper (1:10000 in Wasch-Puffer verdünnt) für 40 min inkubiert wurde. Der zweite Antikörper stammte aus einer anderen Spezies als der Primärantikörper und war an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP, horseradish-peroxidase) gekoppelt, über welches die Bindung visualisiert werden konnte. Anschließend wurde, wie oben beschrieben, gewaschen. Am Schluss wurde die Membran für 1 min mit ECL (ECL1:ECL2 im Verhältnis 1:1) inkubiert, in Frischhaltefolie eingewickelt und in eine Expositionskassette gelegt. Zur Dokumentation der Signale wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und dieser im Filmentwickler entwickelt.

<u>1 X PBS-Lösung:</u>	8 g NaCl
(pH 7,4)	0,2 g KCl
	1,15 g Na ₂ HPO ₄
	0,24 g KH ₂ PO ₄
	H ₂ O ad 1 l

<u>Wasch-Puffer entspricht PBS-T:</u>	0,4% Tween 20 in 1 X PBS
(Antikörper wurden mit PBS-T verdünnt)	

<u>Blocking-Puffer:</u>	10% Magermilchpulver in PBS-T
-------------------------	-------------------------------

Western Stripping:

Zum Ablösen der Antikörper wurde die Membran mit dem Stripping Puffer bei 50 – 70°C für 30 – 60 min. inkubiert, anschließend wurde sie in PBS-T 15 min bei Raumtemperatur gewaschen. Nach dieser Prozedur konnte sie erneut mit 1. und 2. Antikörper versetzt werden.

<u>Stripping Puffer:</u>	70 mM Tris, pH 6,7
	100 mM β -Mercaptoethanol
	2 % SDS
	H ₂ O ad 50 ml

2.17. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Zur Identifizierung und Charakterisierung von Protein-DNA-Komplexen *in vitro* wurden EMSAs durchgeführt. Ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment wurde mit Proteinextrakten, in diesem Fall Kernextrakten, da die meisten DNA bindenden Proteine im Kern lokalisiert sind, inkubiert. Die entstandenen Protein-DNA-Komplexe wurden in einem nativen Polyacrylamidgel analysiert. Die Auswertung des Gels erfolgte nach Geltrocknung mittels Autoradiographie. Die Spezifität des Protein-DNA-Komplexes wurde in Konkurrenzexperimenten bestimmt. Zu dem radioaktiv markierten DNA-Fragment wurde der Inkubationslösung ein Überschuss an nicht markiertem Fragment (Kompetitor) zugesetzt. War der Komplex spezifisch, nahm die Signalintensität ab, da der Kompetitor das Protein gebunden hatte.

Um die Identität des spezifischen DNA-Bindeproteins festzustellen, wurden Supershift-Experimente durchgeführt. Es wurde der Inkubationslösung ein Antikörper gegen ein bekanntes Protein zugegeben. Wurde hierbei entweder eine zusätzlich Bande mit verzögertem Laufverhalten („Supershift“) oder eine deutliche Abnahme der Signalintensität erhalten, wies dies darauf hin, dass es sich bei dem DNA-Bindeprotein um das bekannte Protein handelte, gegen das der Antikörper gerichtet war.

2.17.1. Radioaktive Markierung der DNA-Fragmente (Oligonukleotide)

Vor der radioaktiven Markierung mit [α ³²P] ATP mussten die komplementären, einzelsträngigen und sequenzspezifischen DNA-Fragmente (Oligonukleotide)

durch Hybridisierung doppelsträngig gemacht werden. Die synthetisch hergestellten Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie 5'-überstehende Enden besaßen (GATC), die direkt von der Klenow-Polymerase mit [$\alpha^{32}\text{P}$] ATP und komplementären, unmarkierten Nukleotiden aufgefüllt werden konnten. Die Hybridisierung erfolgte durch Mischen von 5-50 μl Oligonukleotid-A (1 mg/ml) und 5-50 μl Oligonukleotid-B (1 mg/ml) mit 2-20 μl 50 mM Tris-Cl pH 8,0 und 50 mM MgCl_2 . Der Hybridisierungsansatz wurde 5 min bei 55°C inkubiert, anschließend abgekühlt und konnte so bis zur radioaktiven Markierung bei -20°C gelagert werden.

Die doppelsträngigen Oligonukleotide wurden mit [$\alpha^{32}\text{P}$] ATP mittels 3'-Endmarkierung, einer Auffüllreaktion, durch das Enzym Klenow-Fragment markiert. Dazu wurden 1 μl hybridisiertes Oligonukleotid (10 pmol/ μl), 2 μl 10 x Klenow-Puffer, 1 μl 2 mM dGTP, dCTP, dTTP, 10 μl [$\alpha^{32}\text{P}$] ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$), 1 μl Klenow-Fragment und 5 μl H_2O mischen und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Direkt im Anschluss erfolgte die Abtrennung überschüssiger, freier radioaktiv markierter [$\alpha^{32}\text{P}$] ATP Nukleotide von den markierten Oligonukleotiden durch Sephadex G-25 Säulen (Roche, Mannheim, BRD) gemäß Herstellerprotokoll.

Der radioaktive Einbau wurde in einem β -Counter bestimmt.

2.17.2. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

10 μg des zu untersuchenden Proteinextraktes bzw. 5 μl TNT[®]lysate Reaktion wurden mit 50 mM KCl, 4 μl 5x EMSA-Puffer, 1 μg poly-dIdC, 40.000 cpm/ μl [$\alpha^{32}\text{P}$] ATP markiertem Oligonukleotid und H_2O bis zu einem Volumen von 20 μl versetzt. Je nach Ansatz wurde noch 1 μl 100x spezifischer Kompetitor (unmarkiertes Oligonukleotid) oder 2 μl Antikörper für Supershift-Analysen hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend auf ein 5%-iges Polyacrylamidgel geladen. Das Polyacrylamidgel wurde zwischen zwei fettfreie Glasplatten in einen Höfer-Giesstand gegossen. Nach Polymerisation wurde es in die Höfer-Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit 0,5 x TBE-Puffer befüllt. Nach einer Vorelektrophorese für 15 min bei

100 Volt wurden die Proben und der Marker geladen. Die vertikale Gelelektrophorese erfolgte bei 180 Volt, bis der Farbstoff des Markers das untere Ende des Gels erreicht hatte (ca. 1-2 h). Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Gel auf ein Filterpapier (Whatmanpapier, Hartenstein Würzburg, BRD) gelegt, mit Frischhaltefolie luftblasenfrei abgedeckt und für 1 h bei 80°C in einem Gelrockner unter Vakuum getrocknet. Das getrocknete Gel wurde in eine Expositionskassette mit Verstärkerfolien gelegt und über Nacht bei -80°C auf einem Autoradiographiefilm exponiert. Am nächsten Tag wurde der exponierte Film entwickelt und analysiert.

<u>5x EMSA-Puffer:</u>	KPO ₄ pH 7,9	100 mM
	EDTA pH 8,0	5mM
	DTT	5mM
	Glycerol	20%
	H ₂ O	ad 10 ml

<u>10x TBE-Puffer:</u>	Tris-Base	108 g
	0,5 M EDTA pH 8,0	40 ml
	Borsäure	55 g
	H ₂ O	ad 1 l

<u>5% Polyacrylamidgel:</u>	10x TBE-Puffer	1,7 ml
	40% PAA	4,4 ml
	40% Ammoniumpersulfat	87,5 µl
	TEMED	35 µl
	H ₂ O	ad 35 ml

2.18. *In vitro* Translation

Die *in vitro* Translation von gewünschten Proteinen erfolgte in einem gekoppelten System in Retikulozytenlysaten. Es wurde hierfür das TNT[®] gekoppelte Retikulozytenlysatsystem (TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System) verwendet, mit Hilfe dessen sehr einfach und schnell Proteine *in vitro* translatiert werden. In dieser Arbeit wurde STAT5b *in vitro* translatiert und später in EMSAs (2.17.) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll. Es wurde statt [³⁵S]-Methionin unmarkiertes Methionin eingesetzt, um später im EMSA keine Interferenzen zwischen [α ³²P] und [³⁵S] zu erreichen.

25 μ l TNT[®]Retikulozytenlysats, 2 μ l TNT[®]Reaktionspuffer, 1 μ l TNT[®]T7-RNA-Polymerase, 1 μ l Aminosäure-Mischung, 1 μ l RNasin Ribonuklease Inhibitor (40 U/ μ l) und 1 μ g STAT5bpcDNA3.1- wurden mit RNase-freiem H₂O zu einem Endvolumen von 50 μ l aufgefüllt und 90 min bei 30°C inkubiert. 5 μ l dieses Reaktionsansatzes wurden für einen EMSA eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Expression der STAT-Isoformen in INS-1 Zellen

Die Signalübertragung von Leptin erfolgt über den JAK-STAT-Signaltransduktionsweg (44, 46). Für verschiedene Gewebe, unter anderem den Hypothalamus, konnte bereits eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren aus der Familie der signal transducers of cytokine signalling (STAT) bei der Leptinsignalübertragung gezeigt werden. Insbesondere konnte dies für STAT1, STAT3 und STAT5b, und STAT6 nachgewiesen werden (47-49, 51, 54).

In dieser Arbeit wurde mRNA von INS-1 Zellen isoliert und spezifische RT-PCRs für STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6 (Annealing Temperatur 55°C, 36 Zyklen) angefertigt. Eine Expression konnte für die Isoformen STAT1, STAT3, STAT5b und auch STAT6 (Abb.3.1.) nachgewiesen werden. Unter den gleichen Bedingungen konnte für STAT2, STAT4 und STAT5a keine mRNA Expression detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass Bestandteile des JAK-STAT-Signalübertragungsweges in INS-1 Zellen exprimiert werden und diese Zelllinie für weitere Untersuchungen der Leptinsignalübertragung geeignet erscheint.

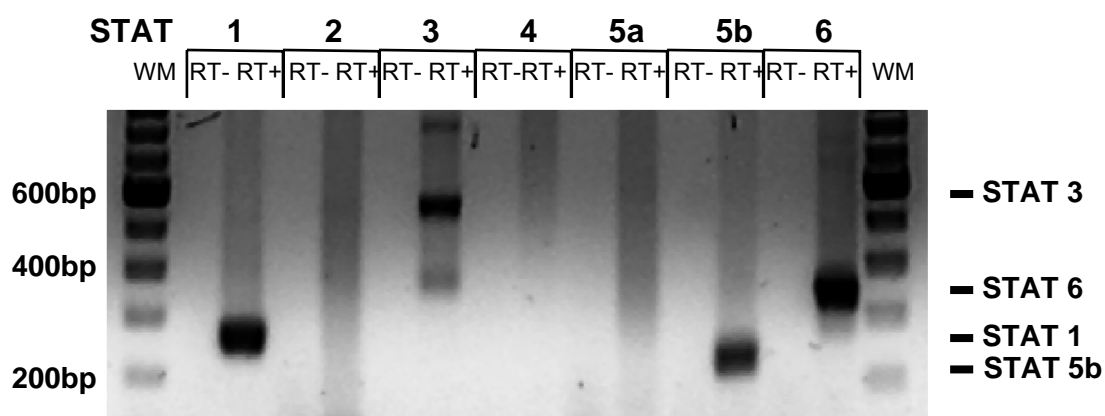


Abb. 3.1.: mRNA-Expression von STAT1, STAT3, STAT5b und STAT6 in INS-1 β -Zellen. RT-PCR mit mRNA von INS-1 Zellen mit spezifischen Oligonukleotiden für die Transkriptionsfaktoren STAT1 bis STAT6. WM, molecular weight marker; RT-, reverse Transkription ohne reverse Transkriptase, zur Kontrolle der DNA-Kontamination; bp. Basenpaare.

3.2. Zeitabhängige Rekrutierung von STAT3 und STAT5b an die Leptinrezeptor-assoziierte Janus-Kinase 2 (JAK2)

Zur Klärung der Frage, ob der JAK-STAT-Signalübertragungsweg in INS-1 Zellen durch Leptin aktiviert wird, wurden INS-1 Zellen, die in serumfreiem Medium wuchsen, zu verschiedenen Zeitpunkten (0h, 30 min, 3h, 6h) mit 100 nM Leptin stimuliert und anschließend Ganzzellextrakte angefertigt. Diese Ganzzellextrakte wurden mit einem Antikörper gegen JAK2 immunpräzipitiert und im Western Blot mit einem Antiphosphotyrosin Antikörper detektiert. Wie in Abbildung 3.2.A. zu sehen ist, bewirkt Stimulation der INS-1 β -Zellen mit Leptin eine zeitabhängige Tyrosinphosphorylierung der Leptinrezeptor assoziierten Janus-Kinase 2. Die Gesamtmenge an immunpräzipitiertem JAK2 bleibt dabei gleich, wie in der unteren Reihe der Abb. 3.2.A. dargestellt. Werden die JAK2 Immunpräzipitate im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3 (Abb. 3.2.B., obere Reihe) bzw. STAT5b (Abb. 3.2.C., obere Reihe) getestet, so erscheint eine Bande, die zeitabhängig (nach 30 min.) an Intensität zunimmt und somit die Leptin abhängige Rekrutierung bzw. Assoziation von STAT3 und STAT5b an bzw. mit JAK2 zeigt. Nach Rekrutierung von STAT3 und STAT5b an JAK2, werden diese beiden Transkriptionsfaktoren zeitabhängig nach Leptinstimulation tyrosinphosphoryliert, wie in Abb. 3.2.B. und 3.2.C. jeweils in der mittleren Reihe zu sehen ist. Hierfür wurden oben beschriebene Ganzzellextrakte mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3 bzw. STAT5b immunpräzipitiert und im Western Blot mit Antiphosphotyrosin Antikörpern detektiert. Wurden die mit STAT3 bzw. STAT5b immunpräzipitierten Ganzzellextrakte im Western Blot mit spezifischen STAT3 bzw. STAT5b Antikörpern getestet, so bleibt die Gesamtmenge an immunpräzipitiertem STAT3 bzw. STAT5b gleich. Es ist keine zeitabhängige Intensitätszunahme nach Leptinstimulation zu verzeichnen (Abb. 3.2.B. und 3.2.C. jeweils untere Reihe). Somit coimmunpräzipitieren in INS-1 Zellen STAT3 und STAT5b mit JAK2 nach Stimulation mit Leptin. Diese Proteininteraktion wird durch Tyrosinphosphorylierung vermittelt.

Für STAT1 und STAT6, die ebenfalls in INS-1 Zellen exprimiert werden (Abb. 3.1.), konnte dies nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass in Insulin produzierenden INS-1 Zellen Leptin eine Rekrutierung von STAT3 und STAT5b an die Leptinrezeptor assoziierte Janus-Kinase 2 bewirkt und diese beiden Transkriptionsfaktoren darüber hinaus phosphoryliert, also aktiviert werden.

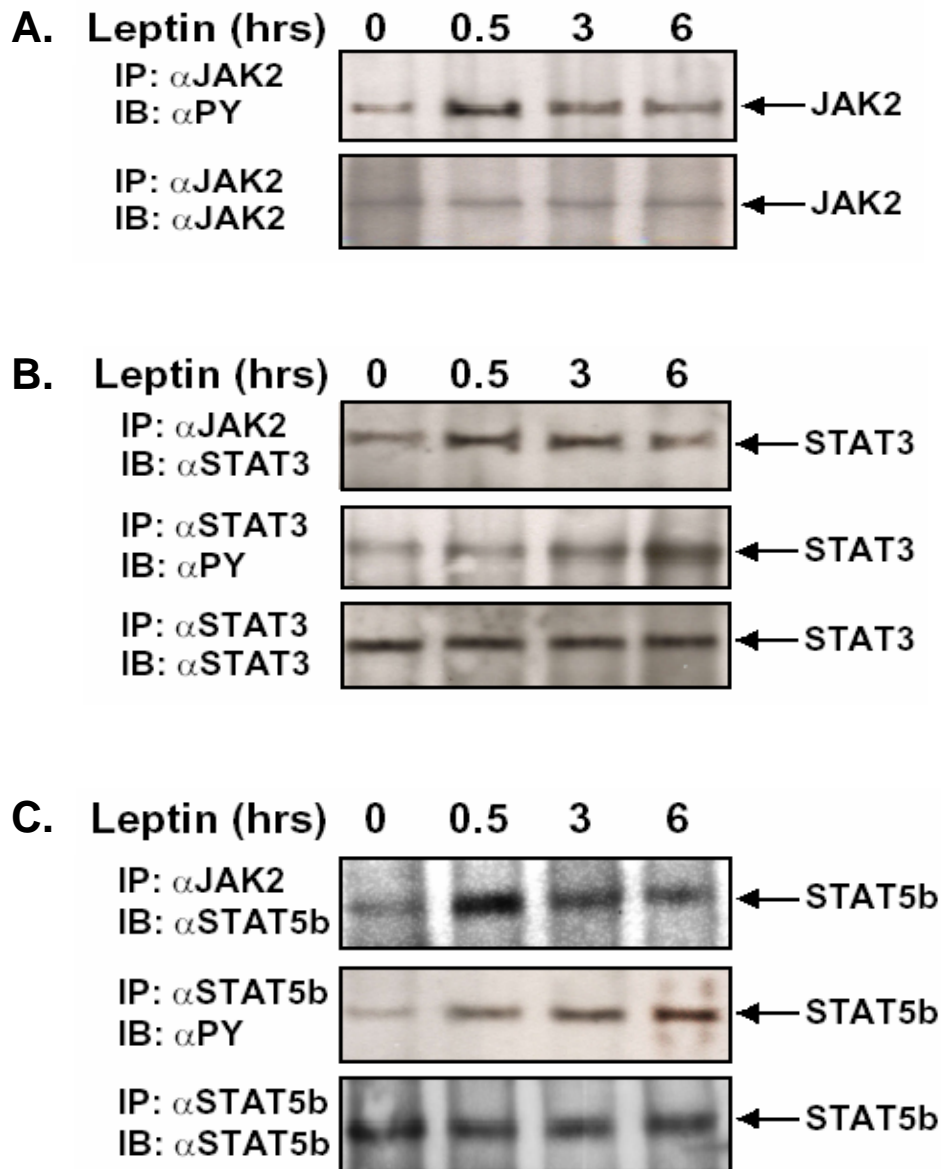


Abb. 3.2.: Leptin induziert die Phosphorylierung von STAT3 und STAT5b über die Rezeptorassoziierte Janus Kinase 2 (JAK2) in INS-1 Zellen. Immunpräzipitation und Western Blot von INS-1 Ganzzelextrakten. Die INS-1 Zellen wurden zuvor mit 100 nM Leptin zu verschiedenen Zeitpunkten stimuliert. **A.** INS-1 Ganzzelextrakt wurden mit einem JAK2 spezifischen Antiserum (α JAK2) immunpräzipitiert (IP), anschließend mittels Western Blot mit einem Antiphosphotyrosinantikörper (α PY) (obere Reihe) detektiert. Als Kontrolle ein Western Blot mit α JAK2 um gleiche Ladung der Lanes zu zeigen (untere Reihe) **B.** INS-1 Ganzzelextrakte wurden mit einem JAK2 spezifischen Antiserum (α JAK2) immunpräzipitiert (IP), anschließend mittels Western Blot mit einem spezifischen STAT3 Antikörper (α STAT3) (obere Reihe) detektiert. INS-1 Zellextrakten α STAT3 immunpräzipitiert (IP), anschließend mittels Western Blot mit α JAK2 (mittlere Reihe) detektiert. Als Kontrolle STAT3 Immunpräzipitate und eine Western Blot mit α STAT3 um gleiche Ladung der Lanes zu zeigen (untere Reihe). **C.** INS-1 Ganzzelextrakte wurden mit einem JAK2 spezifischen Antiserum (α JAK2) immunpräzipitiert (IP), anschließend mittels Western Blot mit einem spezifischen STAT5b Antikörper (α STAT5b) (obere Reihe) detektiert. INS-1 Ganzzelextrakte α STAT5b immunpräzipitiert (IP), anschließend mittels Western Blot mit α JAK2 (mittlere Reihe) detektiert. Als Kontrolle STAT5b Immunpräzipitate und eine Western Blot mit α STAT5b um gleiche Ladung der Lanes zu zeigen (untere Reihe).

3.3. Leptin bewirkt eine Translokation von STAT3 und STAT5b in den Zellkern

Nachdem unter dem Einfluss von Leptin in INS-1 Zellen für STAT3 und STAT5b eine zeitabhängige Rekrutierung an die Rezeptor assoziierte Janus-Kinase 2 und Phosphorylierung gezeigt werden konnte, war, gemäß der JAK-STAT-Signalkaskade, der nächste Schritt, zu untersuchen, ob diese auch leptinabhängig in den Zellkern der INS-1 Zellen translozieren, um dort die Expression spezifischer Gene zu regulieren. Dieser Nachweis wurde durch Fluoreszenzimmuncytochemie erbracht. Hierfür wurden INS-1 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (0 min, 30 min, 1h, 3h, 6h) mit 6,25 nM (100 ng/ml) Leptin oder Vehikel inkubiert. Die stimulierten Zellen wurden zuerst mit einem STAT3 bzw. STAT5b spezifischen Primärantikörper inkubiert. Die subzelluläre Lokalisation wurde nach Inkubation der Zellen mit einem fluoreszierenden Cy-3 (Indocarbocyanid, rot fluoreszierend) gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Wie in Abb. 3.3. ersichtlich, ist STAT3 bzw. STAT5b in den meisten Zellen 30 min nach Inkubation mit Leptin im Zellkern nachweisbar, im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (Inkubation mit Vehikel). Auch nach 3 h waren die STAT-Moleküle noch überwiegend im Zellkern zu finden. Erst nach 6 h waren sie wieder größtenteils im Zytoplasma darstellbar.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Leptin in Insulin produzierenden Zellen die nukleäre Translokation von STAT3 und STAT5b, nach einer Aktivierung des JAK-STAT-Signalübertragungsweges, bewirkt.

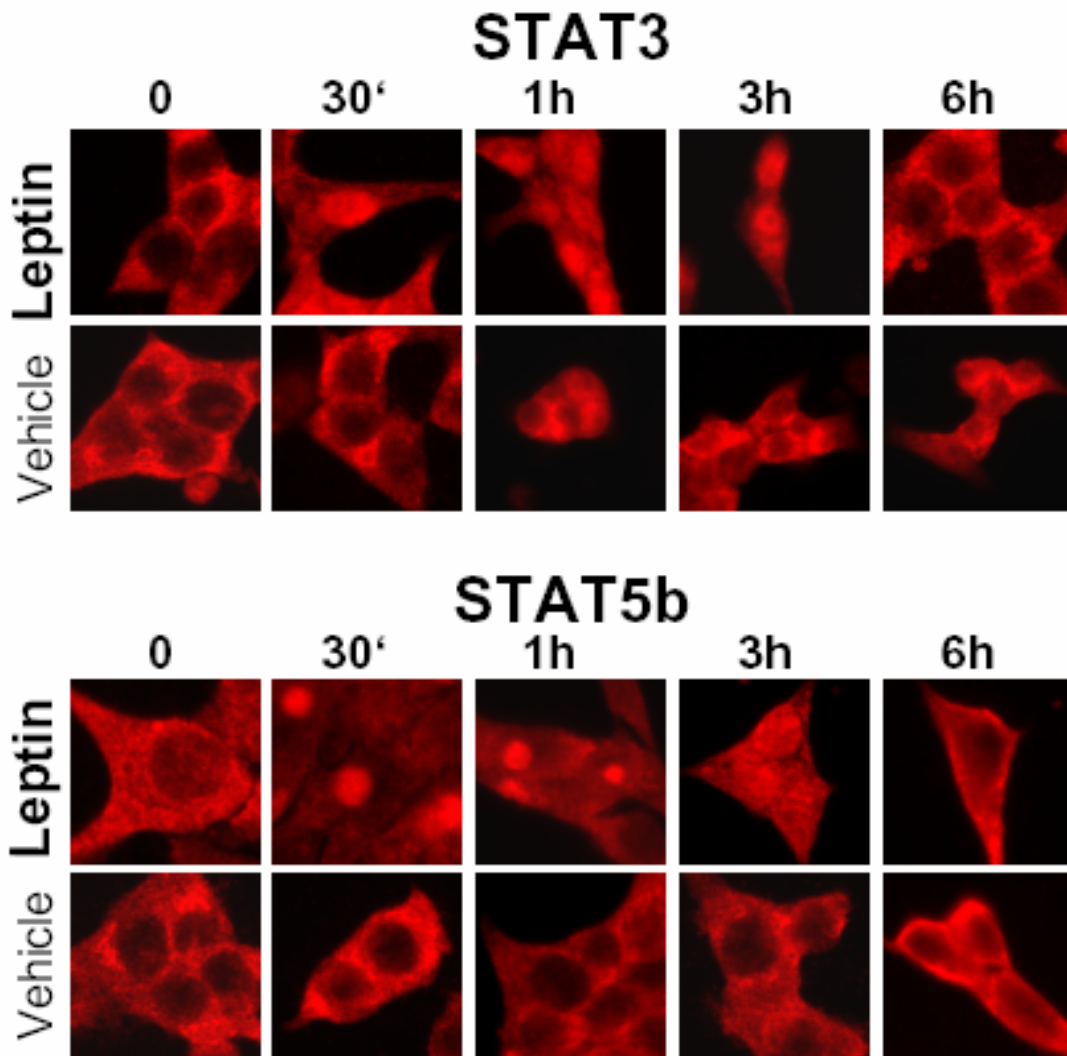


Abb. 3.3.: Nukleäre Translokation von STAT3 und STAT5b nach Stimulation mit Leptin in INS-1 Zellen. INS-1 Zellen wurden auf Objektträgern eine Nacht ohne Serum und Antibiotika kultiviert und anschließend für verschiedene Zeitperioden mit 6,25 nM (100 ng/ml) stimuliert. Die subzelluläre Lokalisation von STAT3 und STAT5b wurde mittels Fluoreszenzimmunzytochemie mittels eines spezifischen STAT3 bzw. STAT5b Primärserums und einem mit Cy-3 (Indocarbocyanid; rot fluoreszierend) fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper detektiert. Nach 30 min sind STAT3 und STAT5b in den Leptin stimulierten INS-1 Zellen im Vergleich zu den Vehikel stimulierten Zellen im Kern zu finden, nach 6 h wieder im Zytoplasma.

3.4. Untersuchungen zur Insulingenpromotoraktivität

3.4.1. STAT3 und STAT5b aktivieren den 410 Basenpaarlangen Ratten-Insulingenpromotor 1 (-410rINS-1pGI3)

In dieser Arbeit zeigte sich eine Leptin vermittelte Aktivierung von STAT3 und STAT5b über den JAK-STAT-Signalübertragungsweg. Um zu überprüfen, ob diese Aktivierung von STAT3 und STAT5b in direktem Zusammenhang mit der in früheren Arbeiten gezeigten Hemmung des Ratten-Insulingenpromotors 1 durch Leptin in INS-1 Zellen (34) steht, wurden Luciferase-Reporterergen Versuche durchgeführt.

Es erfolgten transiente Kotransfektionen in INS-1 Zellen mit DNA-Konstrukten, die zur Überexpression von STAT3 und STAT5b führen bzw. dem leeren Expressionsplasmid pcDNA3.1- und dem Luciferase Reporterergen, das unter der Kontrolle des vorher liegenden -410 Basenpaar langen Ratten-Insulingenpromotors 1 (-410rINS-1pGL3) stand. Kotransfektion von STAT3 bzw. STAT5b zeigen in INS-1 Zellen eine 3- bis 4,5-fach gesteigerte Aktivität des 410 Basenpaar langen Ratten-Insulingenpromotors 1, im Gegensatz zu dem leeren Expressionsplasmid pcDNA3.1- (siehe Abb. 3.4.). Diese vermehrte Aktivität wurde in gleichen Transfektionsexperimenten, in denen statt -410rINS1pGI3 der leere Kontrollvektor pGI3basic verwendet wurde, nicht beobachtet.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Leptin vermittelte Hemmung des Ratten-Insulingenpromotors 1 in Insulin produzierenden Zellen nicht direkt über die Aktivierung von STAT3 und STAT5b über den JAK-STAT-Signalübertragungsweg erfolgt. Sie deuten vielmehr darauf hin, dass bei der Hemmung des Ratten-Insulingenpromotors 1 durch Leptin weitere Mechanismen eine Rolle spielen, möglicherweise spezifische Inhibitoren dieser Signalkaskade.

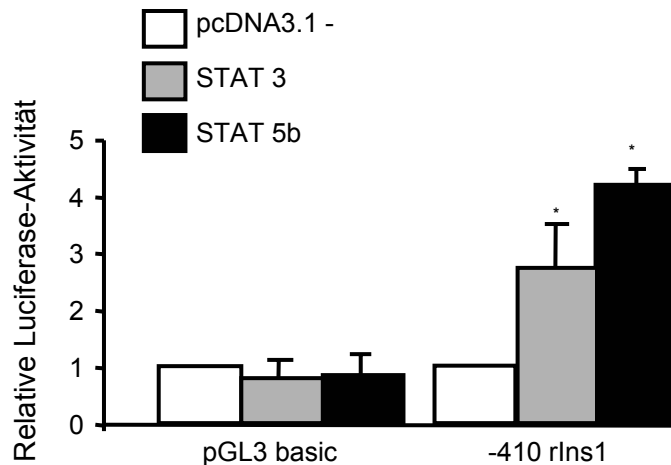


Abb. 3.4.: STAT3 und STAT5b aktivieren den Ratten-Insulingenpromotor 1 (-410rINS-1pGI3) in INS-1 Zellen. Luciferase-Reportergen Versuch in INS-1 Zellen. Diese wurden mit Expressionsplasmiden zur Überexpression von STAT3 bzw. STAT5b (rSTAT3pcDNA3.1-; rSTAT5bpcDNA3.1-) (1,5 µg DNA) bzw. dem Kontrollvektor (pcDNA3.1-) (1,5 µg DNA), sowie dem Reporter gen -410rINS-1pGI3 (1 µg DNA) transient transfiziert. Als Kontrolle wurde der leere Reporter gen-Vektor pGI3basic mit STAT3, STAT5b bzw. pcDNA3.1- transient transfiziert. * $p < 0,01$.

3.4.2 Die Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotor 1 durch STAT5b erfolgt nicht ausschließlich über das STAT responsive Element

Aufgrund der Tatsache, dass STAT3 und STAT5b in INS-1 Zellen den Ratten-Insulingenpromotor 1 aktivieren, wurde dies näher untersucht, zumal im Ratten-Insulingenpromotor 1 verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, unter anderem auch für Transkriptionsfaktoren aus der Familie der signal transducer and activator of transcription (STAT) bekannt sind (109, 110, 115). Es wurde hierbei vor allem auf STAT5b fokussiert, da in früheren Arbeiten unter dem Einfluss von Leptin eine vermehrte Bindung von STAT5b an spezifische STAT responsive DNA-Bindungs-elemente im Ratten-Insulingenpromotor 1 gezeigt werden konnte (34). Als Erstes wurden Promotorkonstrukte des 410bp langen Ratten-Insulingenpromotor (-410rINS-1pGL3) angefertigt, bei denen die bekannte STAT-Bindungsstelle 5`deletiert war, also fehlte bzw. mutiert und somit funktionsuntüchtig war. Diese Vektoren wurden mit dem

Expressionsplasmid (rSTAT5bpcDNA3.1-), das zur Überexpression von STAT5b führt, transient kotransfiziert und im Luciferase-Assay getestet. Wie in Abbildung 3.5. zu sehen, kam es zu keiner Änderung der transkriptionellen Aktivität der verschiedenen Vektoren. Es ist somit davon auszugehen, dass die Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotors 1 in INS-1 Zellen durch STAT5b nicht ausschließlich über das STAT responsive Element erfolgt, da sowohl nach Deletion (-307rINS1pGI3) als auch nach Mutation (-410rINS1mutSTATpGI3) die Promotoraktivität bei Überexpression von STAT5b erhalten bleibt.

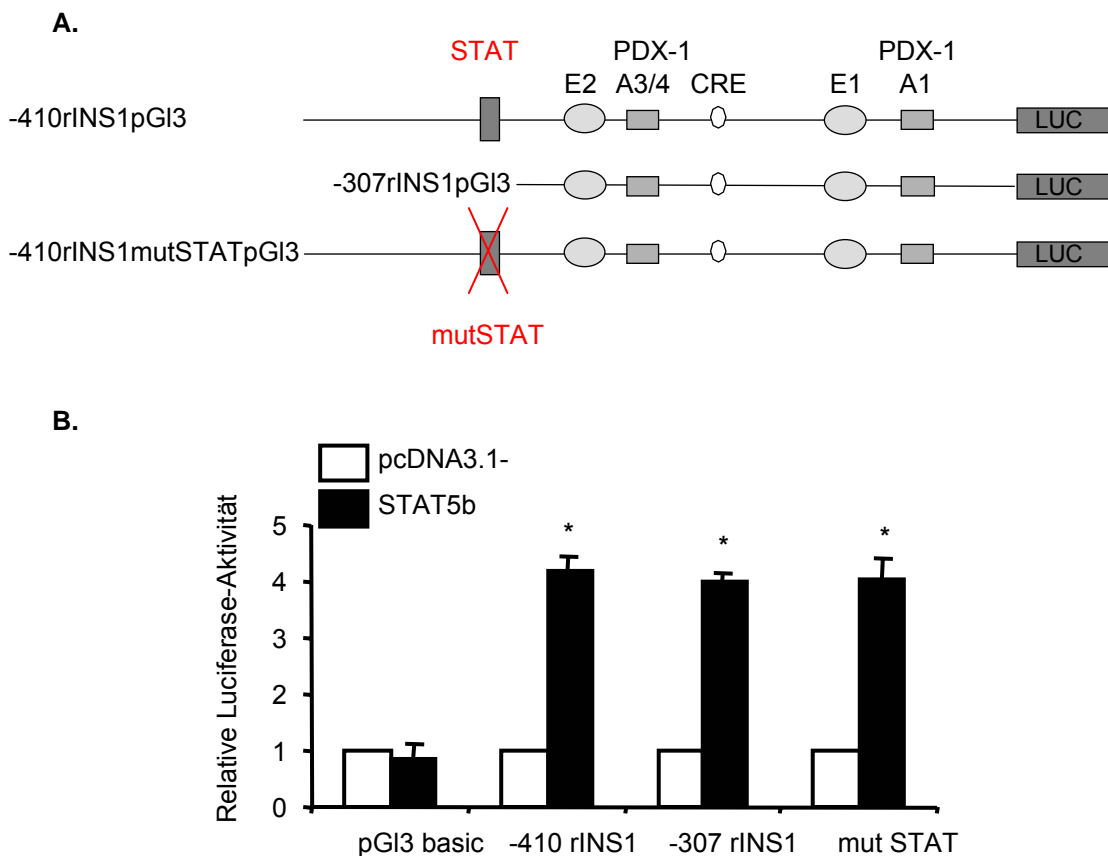


Abb.: 3.5.: A. Responsive Elemente im Promotor des Proinsulin-1-Gens der Ratte. Am distalen Ende befindet sich ein STAT responsives Element, der Inselzell-spezifische Homeodomain-Transkriptionsfaktor PDX-1 bindet an die A-Elemente. Dem Vektor -307rINS1pGI3 fehlt das STAT responsive Element, bei dem Vektor -410rINS1mutSTATpGI3 ist das STAT responsive Element mutiert. **B. Mutationsanalysen des rINS-1 Promotors in INS-1 Zellen.** Luciferase-Reportergen Versuche in INS-1 Zellen mit dem mutierten -410rINS1pGI3 Vektor (je 1 µg DNA). 5'-Deletion und Block-Mutation des STATresponsiven Elementes und Kotransfektion mit dem Expressionsplasmid rSTAT5bpcDNA3.1- (1,5 µg DNA). Persistenz der 4,5 fachen Aktivierung. * p<0,01.

Wie in Abbildung 3.5.A zu sehen ist, sind im Ratten-Insulingenpromotor 1 neben der STAT-Bindungsstelle noch andere Bindungselemente bekannt, nämlich die E-Elemente, das CRE-Element und die A-Elemente. An die A-Elemente bindet der Homeodomain-Transkriptionsfaktor PDX-1, der ein zentraler Regulator der β -Zellfunktion und -differenzierung ist.

Für weitere Transfektionsexperimente wurden Vektoren des 410bp langen Ratten-Insulingenpromotors 1 hergestellt, bei denen die oben genannten Elemente systematisch 5'-deletiert wurden. Diese Vektoren wurden wiederum mit dem Expressionsplasmid STAT5b (rSTAT5bpcDNA3.1-) transient transfiziert und anschließend ein Luciferase-Assay angefertigt. Die transkriptionelle Aktivität des Ratten-Insulingenpromotors 1 nahm, wie in Abbildung 3.6. zu sehen ist, stufenweise ab. Nach Deletion der STAT-Bindungsstelle ist eine geringe Abnahme der Aktivität zu sehen. Die stärkste und signifikanteste Abnahme ist nach Deletion des A3/4-Elements, der PDX-1 Bindungsstelle zu beobachten, was auf eine funktionelle Interaktion von STAT5b mit PDX-1 bei der Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotors hindeutet.

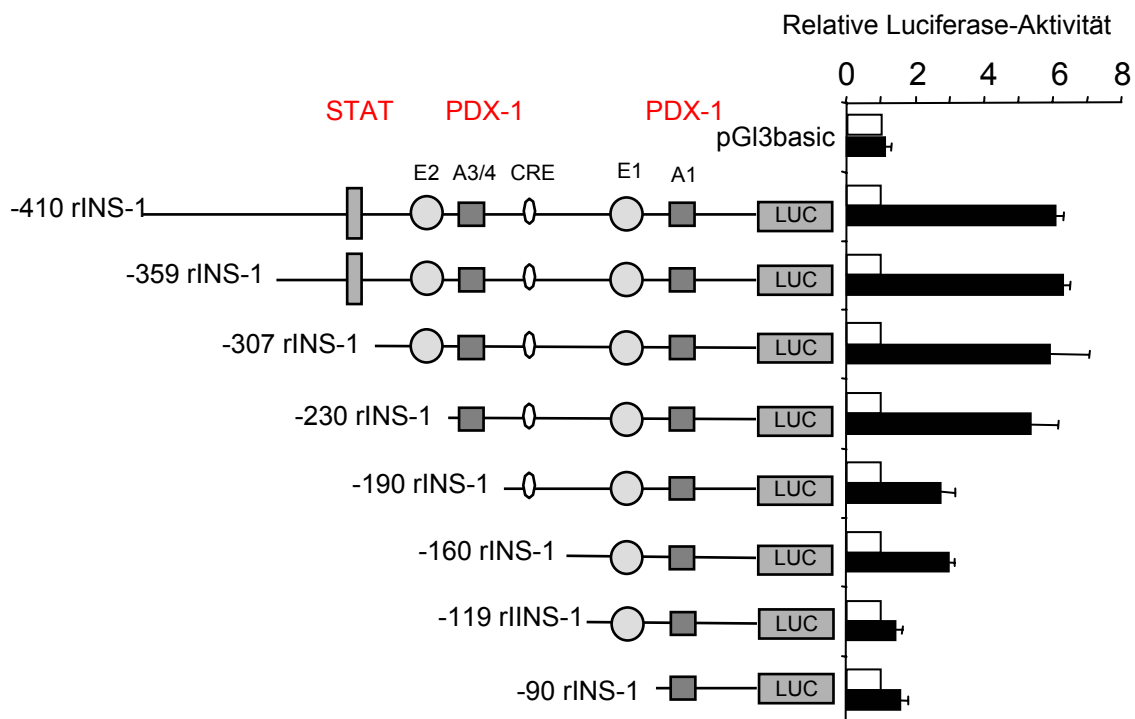


Abb.: 3.6.: Mutationsanalyse des rINS-1 Promotors in INS-1 Zellen. Luciferase-Reportergergen Versuche in INS-1 Zellen mit 5'-Deletionen des gesamten Promotors (je 1 μ g DNA) und mit Kotransfektion mit dem Expressionsplasmid rSTAT5bpcDNA3.1- (1,5 μ g DNA). Reduktion der Aktivierung nach Deletion des A3 und E1 Elementes. * $p < 0,01$.

3.4.3. CBP/p300 vermittelt die funktionelle Interaktion von STAT5b und PDX-1 am Ratten-Insulingenpromotor 1

Mögliche Kandidaten für die Vermittlung der Interaktion von STAT5b und PDX-1 bei der Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotors sind die nukleären Adapterproteine CBP und p300. Für diese nahezu homologen Moleküle ist bekannt, dass sie Koaktivatoren verschiedener Transkriptionsfaktoren, unter anderem auch für STATs und PDX-1 (102-108) sind, sowie an der Aktivierung derselben beteiligt sind.

In INS-1 Zellen erfolgten Kotransfektionen der 5'-Deletionskonstrukte (-410rINS1pGI3, -307rINS1pGI3, -160rINS1pGI3) des Luciferase-Reporter-gen Vektors -410rINS-1pGL3 mit Expressionsplasmiden für STAT5b (rSTAT5bpcDNA3.1-), p300 und E1A. E1A ist ein adenovirales Protein, das an CBP/p300 binden und dieses somit spezifisch hemmen kann. Die transkriptionelle Aktivität der verschiedenen Promotorkonstrukte wurde anschließend im Luciferase-Assay gemessen.

In Abbildung 3.7. zeigt sich bei Kotransfektion des STAT5b Expressionsplasmides mit dem 410 bp bzw. 307 bp langen Ratten-Insulingenpromotor 1 in INS-1 Zellen eine Verdopplung der Promotoraktivität. Bei zusätzlicher Kotransfektion des p300 Expressionsplasmids vervierfacht sich die Promotoraktivität im Vergleich zum Basalwert. Im Gegensatz dazu war bei Kotransfektion mit einem E1A Expressionsplasmid anstelle oder zusätzlich zum p300 Expressionsplasmid keine Aktivierung der Promotorkonstrukte zu beobachten. Das Gegenteil war der Fall. Es zeigte sich eine Hemmung der Promotorkonstrukte auf ca. 50% des Basalwerts. Diese synergistischen Effekte konnten am 160 bp langen Ratten-Insulingenpromotor 1, dem das A3/4 Element also eine PDX-1 Bindungsstelle fehlt, nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass eine funktionelle Interaktion von STAT5b und p300 am Ratten-Insulingenpromotor 1 sehr wahrscheinlich ist. Diese ist jedoch unabhängig vom STAT-responsiven DNA-Element.

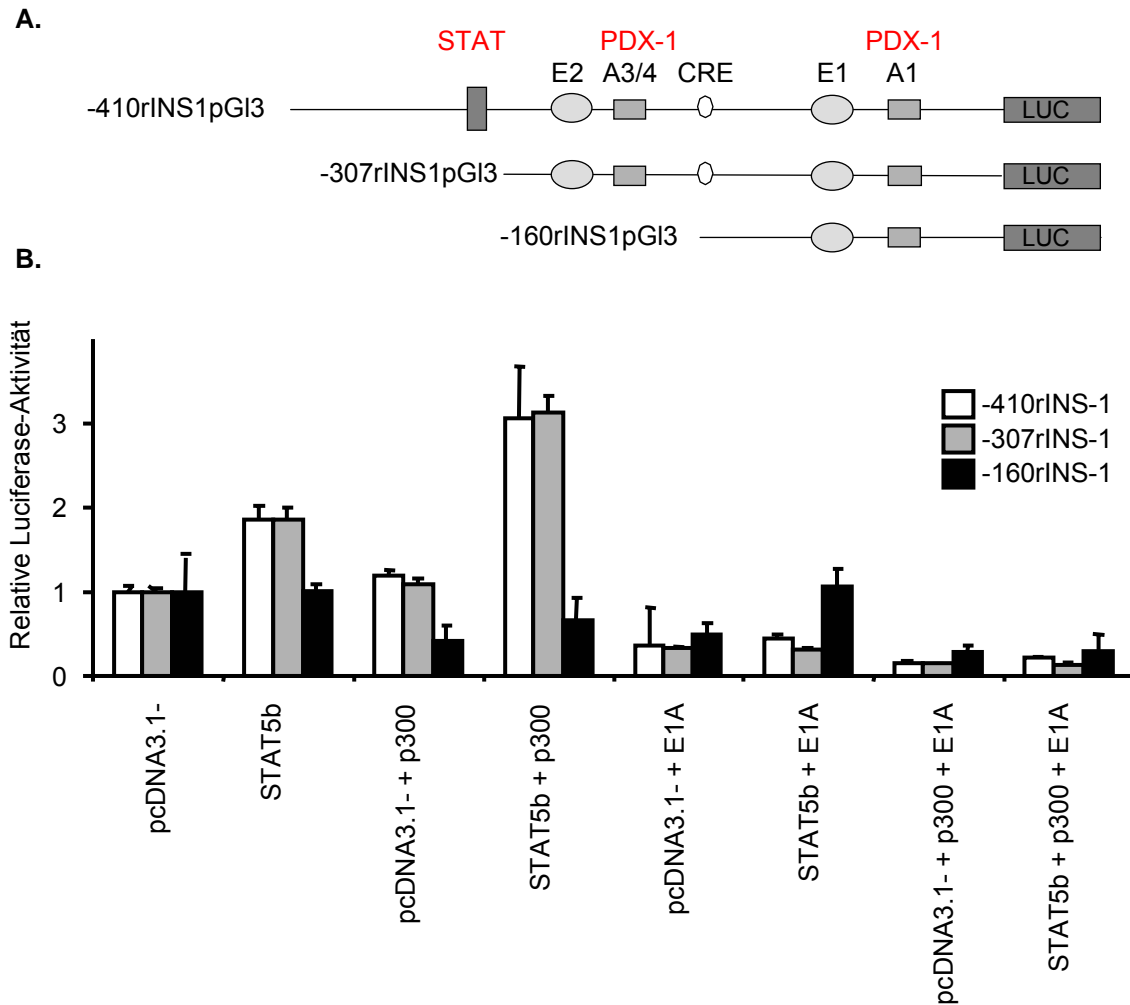


Abb.: 3.7.: A. Responsive Elemente im Promotor des Proinsulin-1-Gens der Ratte. Dem Vektor -307rINS1pGI3 fehlt die distale STAT-Bindungsstelle. Dem Deletionskonstrukt -160rINS1pGI3 fehlt weiterhin das E2, das A3/4 sowie das CRE-Element. **B. Die funktionelle Interaktion von STAT5b und PDX-1 am Ratten-Insulingenpromotor 1 ist unabhängig vom STAT responsiven DNA-Element.** Luciferase-Reportergergen Versuche in INS-1 Zellen mit 5'-Deletionskonstrukten (je 1µg DNA) und den Expressionsplasmiden rSTAT5bpcDNA3.1- (1,5 µg DNA), p300 und E1A (je 1,5 µg DNA).

Die signifikanteste Abnahme der Aktivität des Ratten-Insulingenpromotors 1 nach Überexpression von STAT5b war nach Deletion des A3/4 Elements, der PDX-1 Bindungsstelle, zu verzeichnen (Abb. 3.6.). Weiterhin war die synergistische Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotors 1 durch STAT5b und p300 nach Deletion des A3/4 Elements verschwunden (Abb. 3.7.). In Luciferase-Reportergergen Versuchen mit dem 410 bp langen Ratten-Insulingenpromotor 1, sowie dem 410 bp langen Ratten-Insulingenpromotor 1

mit mutierter STAT-Bindungsstelle und Kotransfektion mit STAT5b wurden diese auf das Doppelte des Ausgangswerts aktiviert. Bei zusätzlicher Kotransfektion mit PDX-1 erfolgte eine weitere Steigerung der Promotoraktivität, die bei dem 410bp langen Promotorkonstrukt stärker ausgeprägt war, als bei dem Konstrukt mit der mutierten STAT-Bindungsstelle. Diese Steigerung der Promotoraktivität kann in gleicher Weise nochmals erhöht werden bei zusätzlicher Kotransfektion mit p300. Wurden diese Transfektionsexperimente zusätzlich mit E1A durchgeführt, blieb die Aktivierung des Promotorkonstrukts aus bzw. es erfolgte sogar eine Inhibition dieser.

Es scheint somit eine funktionelle Interaktion von STAT5b, p300 und PDX-1 zu geben, die mit für die Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotors 1 verantwortlich ist.

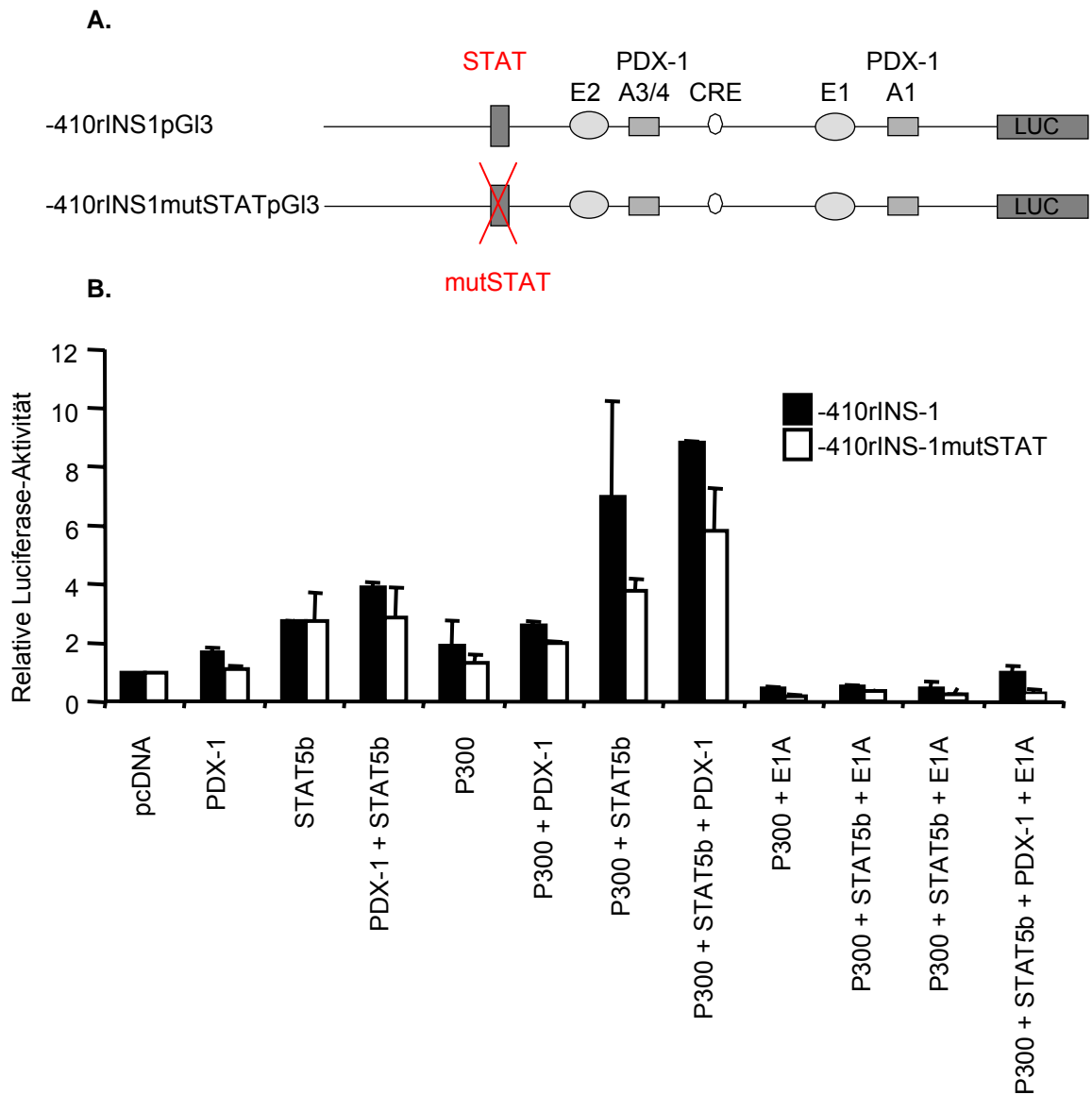


Abb.: 3.8.: A. Responsive Elemente im Promotor des Proinsulin-1-Gens der Ratte. Bei dem Vektor -410rNS1mutSTATpGI3 ist die STAT-Bindungsstelle mutiert. **B. Die funktionelle Interaktion von STAT5b und PDX-1 am Ratten-Insulingenpromotor 1 ist unabhängig vom STAT responsiven DNA-Element.** Luciferase-Reportergergen Versuche in INS-1 Zellen mit 5'-Deletionskonstrukten (je 1µg DNA) und den Expressionsplasmiden rSTAT5bpcDNA3.1- (1,5 µg DNA), PDX-1pcDNA3 (1,5 µgDNA), p300 und E1A (je 1,5 µg DNA).

3.5. Leptin und die Regulation der Insulingen Expression

3.5.1. Leptin induziert die Expression von SOCS3 in INS-1 Zellen

Seit einiger Zeit sind negative Regulatoren der JAK-STAT Signalübertragung bekannt, die Familie der Suppressors of Cytokine Signalling (SOCS) (56).

Speziell für die Isoform SOCS3 konnte im Hypothalamus eine verminderte Leptin Signalübertragung gezeigt werden. Es wird vermutet, dass SOCS3 im Hypothalamus von Nagetieren sowohl *in vitro* (24, 60, 68) als auch *in vivo* (71) eine Leptinresistenz bewirkt. Aus diesen Gründen stellten wir die Hypothese auf, dass SOCS3 ebenso bei der Leptin bedingten Hemmung der Ratten-Insulingenpromotoraktivität in INS-1 Zellen, beteiligt ist.

Als erstes wurde in INS-1 Zellen nachgewiesen, dass Leptin die rSOCS3 Expression induziert. INS-1 Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h) mit 6,25 nM Leptin stimuliert, mRNA isoliert und eine spezifische RT-PCR für rSOCS3 (Annealing Temperatur 55°C, 36 Zyklen) durchgeführt. In Abbildung 3.9. ist zu sehen, dass durch Leptin in INS-1 Zellen eine nahezu gleichmäßige Expression von rSOCS3 induziert wird.

In vivo Daten mit mRNA aus Pankreasinseln von *ob/ob* Mäusen, die zu verschiedenen Zeitpunkten intraperitoneal mit Leptin stimuliert wurden, zeigen einen zeitabhängigen Anstieg der SOCS3 Expression. Nach 6 h Stimulation mit Leptin ist ein signifikanter Anstieg der SOCS3 Expression zu verzeichnen. Diese Daten wurden von Ni Lam aus der Arbeitsgruppe von Tim Kieffer in Canada in einem Kooperationsprojekt angefertigt (Daten sind hier nicht gezeigt).

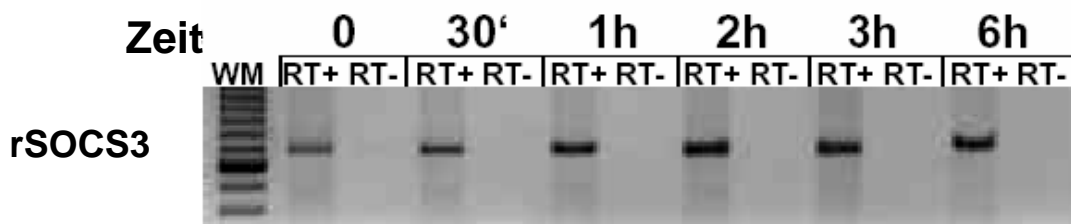


Abb.: 3.9.: Leptin induziert die Expression von SOCS3 in INS-1 Zellen *in vitro*. Spezifische RT-PCR mit mRNA von INS-1 Zellen, die zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h) mit 6,25 nM Leptin stimuliert wurden für SOCS3 der Ratte (rSOCS3). RT- Reverse Transkription ohne Reverse Transkriptase als Kontrolle für DNA- Kontamination, WM molecular weight marker.

3.5.2. Leptin induziert die SOCS3 Expression über STAT vermittelte Promotoraktivierung

Die Expression der SOCS-Moleküle wird über den JAK-STAT-Signalübertragungsweg reguliert (64, 67). Wie oben gezeigt, erfolgt eine vermehrte Expression von SOCS3 unter dem Einfluss von Leptin. Es stellte sich somit die Frage, ob unter dem Einfluss von Leptin auch eine gesteigerte Promotoraktivität zu verzeichnen ist und ob diese eventuell über STATs vermittelt ist.

Nachdem der Ratten SOCS3 Promotor kloniert war, wurden Luciferase-Reportergeräten Versuche in INS-1-Zellen angefertigt. INS-1 Zellen wurden mit dem 1054 bp langen Ratten SOCS3 Promotor transient transfiziert und mit 6,25 nM Leptin stimuliert. Im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten Zellen aktiviert Leptin signifikant den Ratten SOCS3 Promotor in INS-1 Zellen (Abbildung 3.10.A). Dies deutet darauf hin, dass die Induktion von SOCS3 durch Leptin in INS-1 Zellen über transkriptionelle Effekte auf Promotorebene vermittelt wird. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass Leptin in Insulin produzierenden β -Zellen des endokrinen Pankreas die Expression von SOCS3 – einen möglichen Inhibitor der Leptinwirkung (68) - selbst bewirkt.

Wurde das Luciferase-Reportergeräten, das unter der Kontrolle des 1054 bp langen SOCS3 Promotor der Ratte (-1054rSOCS3pGl3) stand, zusammen mit Expressionsplasmiden zur Überexpression von STAT3 (rSTAT3pcDNA3.1-) bzw. STAT5b (rSTAT5bpcDNA3.1-) transient in INS-1 Zellen transfiziert, so wurde der Ratten SOCS3 Promotor signifikant aktiviert (Abbildung 6B und 6C).

Diese Ergebnisse stärken die These, dass in β -Zellen des endokrinen Pankreas die Expression von SOCS3 unter der transkriptionellen Kontrolle von STAT3 und STAT5b steht.

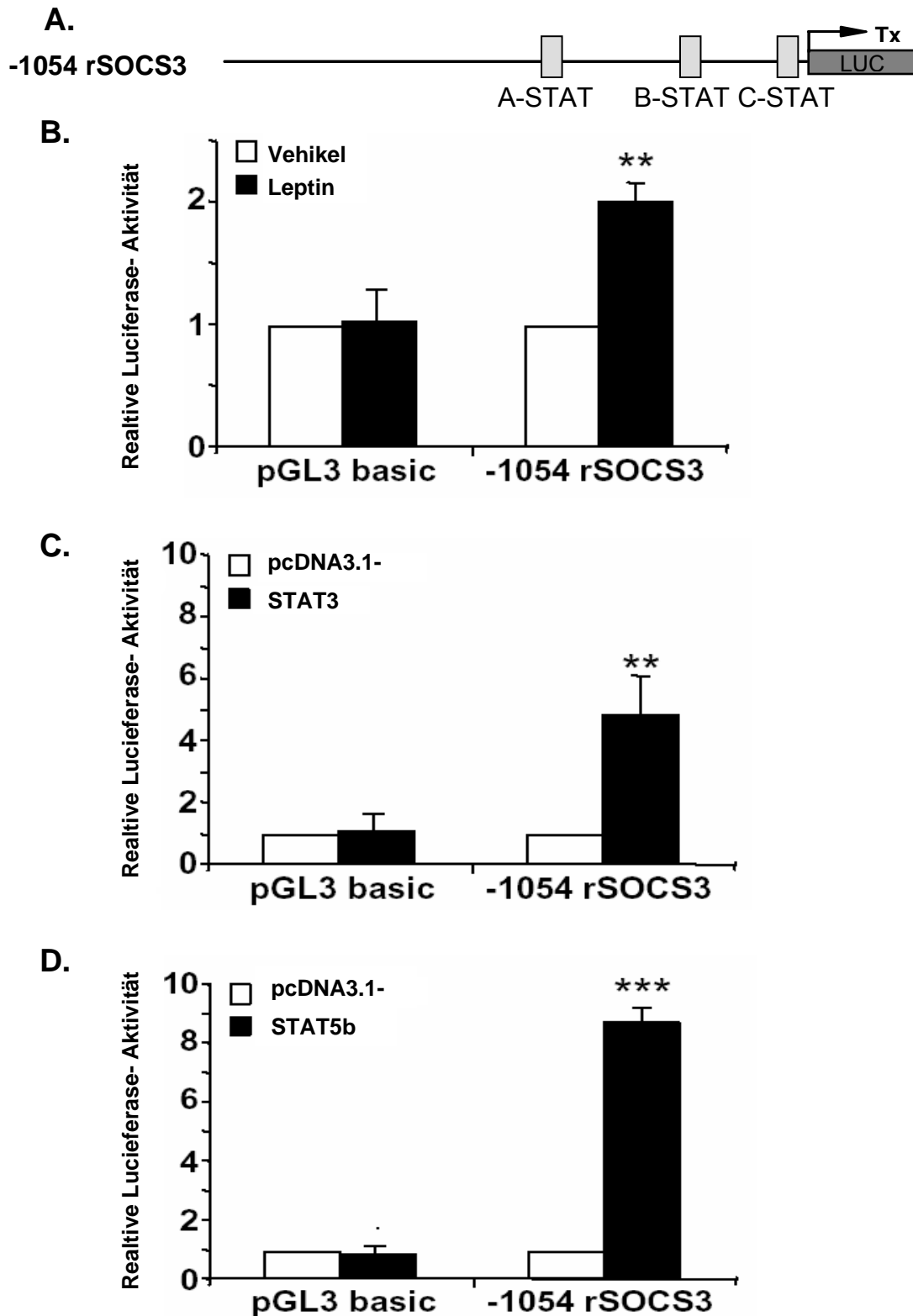


Abb.: 3.10.: Leptin, STAT3 und STAT5b aktivieren den SOCS3 Promotor der Ratte in INS-1 Zellen. **A.** STAT responsive Elemente im rSOCS3 Promtor. Luciferase-Reportergen Versuche in INS-1 Zellen. **B.** INS-1 Zellen wurden mit dem -1054rSOCS3pGL3 bzw. pGL3basic Vektor (je 1 µg DNA) transfiziert und anschließend mit 6,25 nM Leptin oder Vehikel stimuliert. **C.** Koftransfektion des Leervektors oder des STAT3 Expressionsplasmides (rSTAT3pcDNA3.1-) (je 1,5 µg DNA) mit -1054pGL3 bzw. pGL3basic (je 1 µg DNA). **D.** Koftransfektion des Leervektors oder des STAT5b Expressionsplasmides (rSTAT5bpcDNA3.1-) (je 1,5 µg DNA) mit -1054pGL3 bzw. pGL3basic (je 1 µg DNA).

** p<0.01. *** p<0.001.

3.5.3. Leptin induziert die Bindung von STAT3 und STAT5b an spezifische STAT responsive Elemente im SOCS3 Promotor der Ratte in INS-1 Zellen

Im SOCS3 Promotor der Ratte sind drei Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Signal Transducers of Transkription (STATs) bekannt (67). Außerdem ist beschrieben, dass die Induktion der SOCS Gene durch Zytokine, zu denen Leptin zählt, aktivierte Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Signal Transducers of Activation (STATs) benötigen (57). Aus diesem Grund wurde mittels Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) untersucht, ob Leptin DNA-Bindung von STATs an eine der drei bekannten spezifischen STAT responsiven DNA-Sequenzen im -1054rSOCS3 Promotor in Insulin produzierenden β -Zellen des endokrinen Pankreas bewirkt.

Das Oligonukleotid A-STAT, welches das am weitesten distal gelegene STAT responsive Element enthält und den Basenpaaren -363 bis -332 der Sequenz des rSOCS3 Promotors entspricht, sowie das Oligonukleotid C-STAT, welches das am weitesten proximal gelegene STAT responsive Element enthält und den Basenpaaren -83 bis -52 der Sequenz des rSOCS3 Promotors entspricht, wurden mit *in vitro* translatiertem STAT5b Protein inkubiert und ein EMSA angefertigt. Wie in Abbildung 3.11.A gezeigt ist sowohl bei A-STAT als auch bei C-STAT ein DNA-Bindungskomplex nachzuweisen, der spezifisch ist, da er bei 10-fachem Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid verschwindet. Dieser Komplex kann als STAT5b identifiziert werden, da die Bande bei Zugabe von STAT5b-Antikörper an der ursprünglichen Position verschwindet und an einer höheren sichtbar wird (Supershift). In entsprechenden Experimenten mit *in vitro* translatiertem STAT3 konnte weder an A-STAT noch an C-STAT eine Proteinbindung nachgewiesen werden, was zeigt, dass diese Promotorregionen spezifisch für die verschiedenen STAT Proteine sind (Daten nicht gezeigt).

Das Oligonukleotid B-STAT, das der Sequenz von Position -107 bp bis -75 bp des rSOCS3 Promotors entspricht und ebenfalls eine bereits zuvor beschriebene STAT-DNA-Bindungsstelle enthält, wurde mit Kernextrakten von INS-1 Zellen inkubiert und ein EMSA angefertigt. Die Kernextrakte wurden aus

INS-1 Zellen gewonnen, die zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 3 h, 6 h, 12 h) mit 6,25 nM Leptin inkubiert wurden. Wie in Abbildung 3.11.B. zu sehen ist, erscheint bei B-STAT ein DNA-Bindungskomplex, der unter Stimulation mit Leptin zeitabhängig an Intensität zunimmt. Ein Maximum ist nach 6 h erreicht. Dieser Komplex ist spezifisch, da er bei 10-fachem Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid verschwindet. In Supershift-Experimenten mit Antikörpern gegen STAT1, 3 und 5b, konnte er als STAT3 identifiziert werden, da der Komplex bei Inkubation mit STAT3-Antikörpern verschwindet. Diese Ergebnisse zeigen, dass B-STAT spezifisch STAT3 bindet.

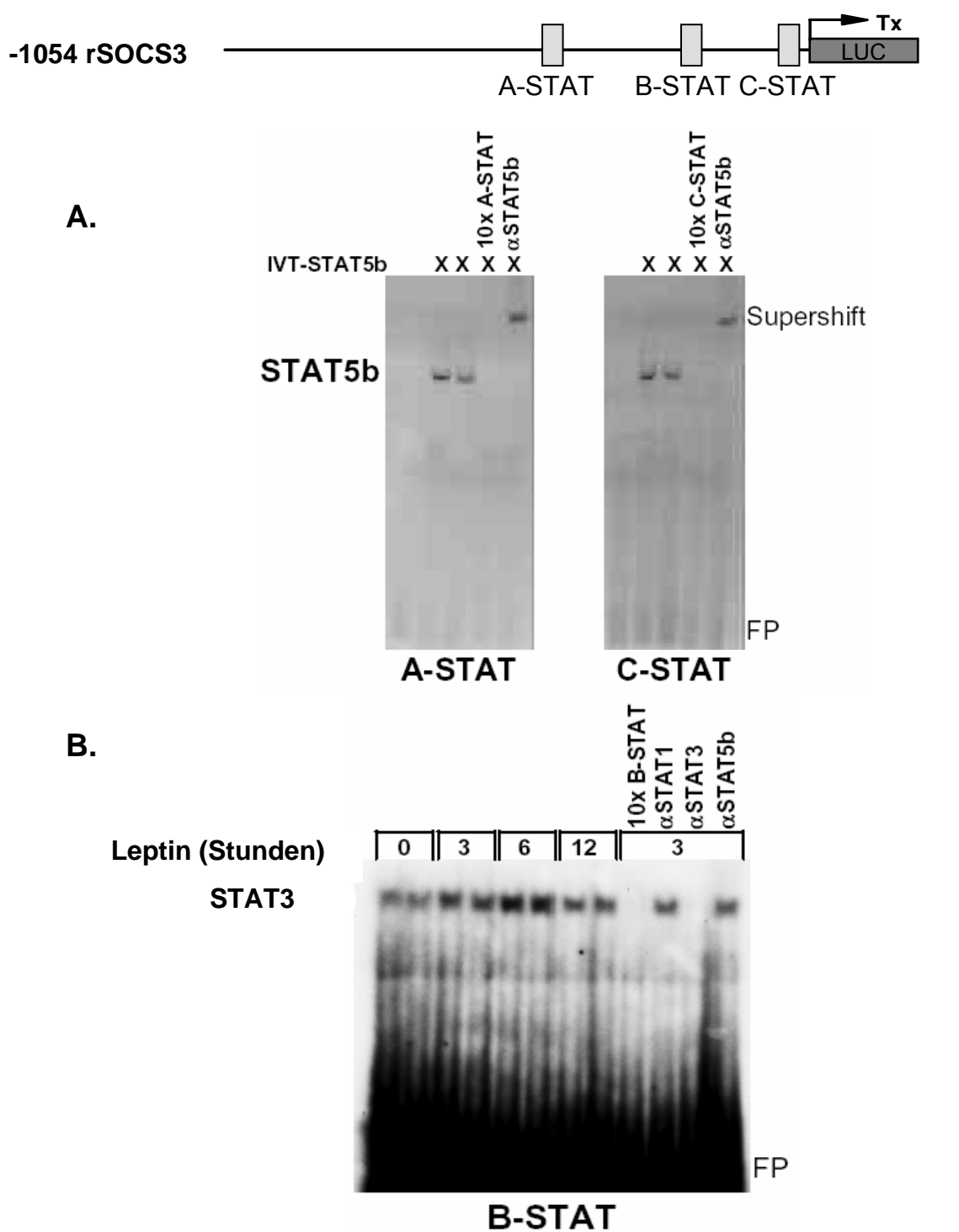


Abb.: 3.11.: Leptin induziert die Bindung von STAT3 und STAT5b an spezifische STAT responsive Elemente im SOCS3 Promotor der Ratte in INS-1 Zellen. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) mit doppelsträngigen Oligonukleotiden für die vorhandenen STAT Bindungsstellen im rSOCS3 Promotor (A-STAT, B-STAT, C-STAT) **A.** *In vitro* translatiertes STAT5b (IVT-STAT5b) wurde mit A-STAT und C-STAT inkubiert. Die DNA-Bindung wurde im EMSA detektiert. Konkurrenzexperimente mit 10-fachem Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid (10x A-STAT, 10x C-STAT). Supershift Experimente erfolgten mit einem spezifischen Antikörper gegen STAT5b (α STAT5b). **B.** Kernextrakte von INS-1 Zellen, die zu verschiedenen Zeitpunkten mit Leptin stimuliert wurden mit B-STAT inkubiert. Die DNA-Bindung wurde im EMSA detektiert. Konkurrenzexperimente mit 10-fachem Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid (10x B-STAT), Supershift Experimente mit spezifischem Antikörper für STAT1 (α STAT1), STAT3 (α STAT3), STAT5b (α STAT5b). FP, freie Probe.

3.5.4. SOCS3 hemmt sowohl die basale als auch die STAT3 und STAT5b vermittelte Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotors 1

In dieser Arbeit wurde eine Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotors 1 (-410rINS1pGI3) durch STAT3 und STAT5b gezeigt (Abb.3.4.). Dies steht im Gegensatz zu der Tatsache, dass Leptin sowohl die Insulinsekretion als auch die Insulingen Expression hemmt (31, 34-36) und diese Hemmung mit einer vermehrten Bindung von STAT5b an spezifische STAT responsive DNA-Bindungselemente im Ratten-Insulingenpromotor 1 verbunden ist (34). Diese Leptin vermittelte Hemmung der Aktivität des Ratten-Insulingenpromotors 1 in INS-1 Zellen scheint demnach nicht durch direkte Effekte STAT3 und STAT5b am Promotor zu erfolgen. SOCS Proteine, deren Expression durch verschiedene Zytokine und auch Leptin induziert wird, sind als negative Regulatoren des JAK-STAT-Signalübertragungsweges bekannt (56, 64, 65). Aus diesem Grund wurde die Hypothese überprüft, ob SOCS3 die Aktivität des Ratten-Insulingenpromotors 1 hemmt und somit ein durch Leptin induzierter Inhibitor der STAT3 und STAT5b abhängigen Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotors 1 ist.

In transienten Kotransfektionen in INS-1 Zellen mit DNA-Konstrukten, die zur Überexpression von SOCS3 (rSOCS3pcDNA3) führen und dem Luciferase Reporter gen, das unter der Kontrolle des 410 bp langen Ratten-Insulingenpromotors 1 stand, zeigte sich, dass rSOCS3 die Aktivität von –410rINS-1pGI3 vermindert (Abbildung 3.12.B). Durch rSOCS3 wird nicht nur die basale Aktivität des Ratten-Insulingenpromotors 1 gehemmt, sondern auch die STAT3 und STAT5b abhängige Aktivierung des 410 bp langen Ratten-Insulingenpromotors 1 (Abbildung 3.12.C. und 3.12.D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass in β -Zellen des endokrinen Pankreas Leptin die Expression von SOCS3 über STAT3 und STAT5b abhängige transkriptionelle Aktivierung des SOCS3 Promotors induziert. SOCS3 wiederum als negativer Regulator vermindert die STAT3 und STAT5b abhängige Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotors 1 in INS-1 Zellen.

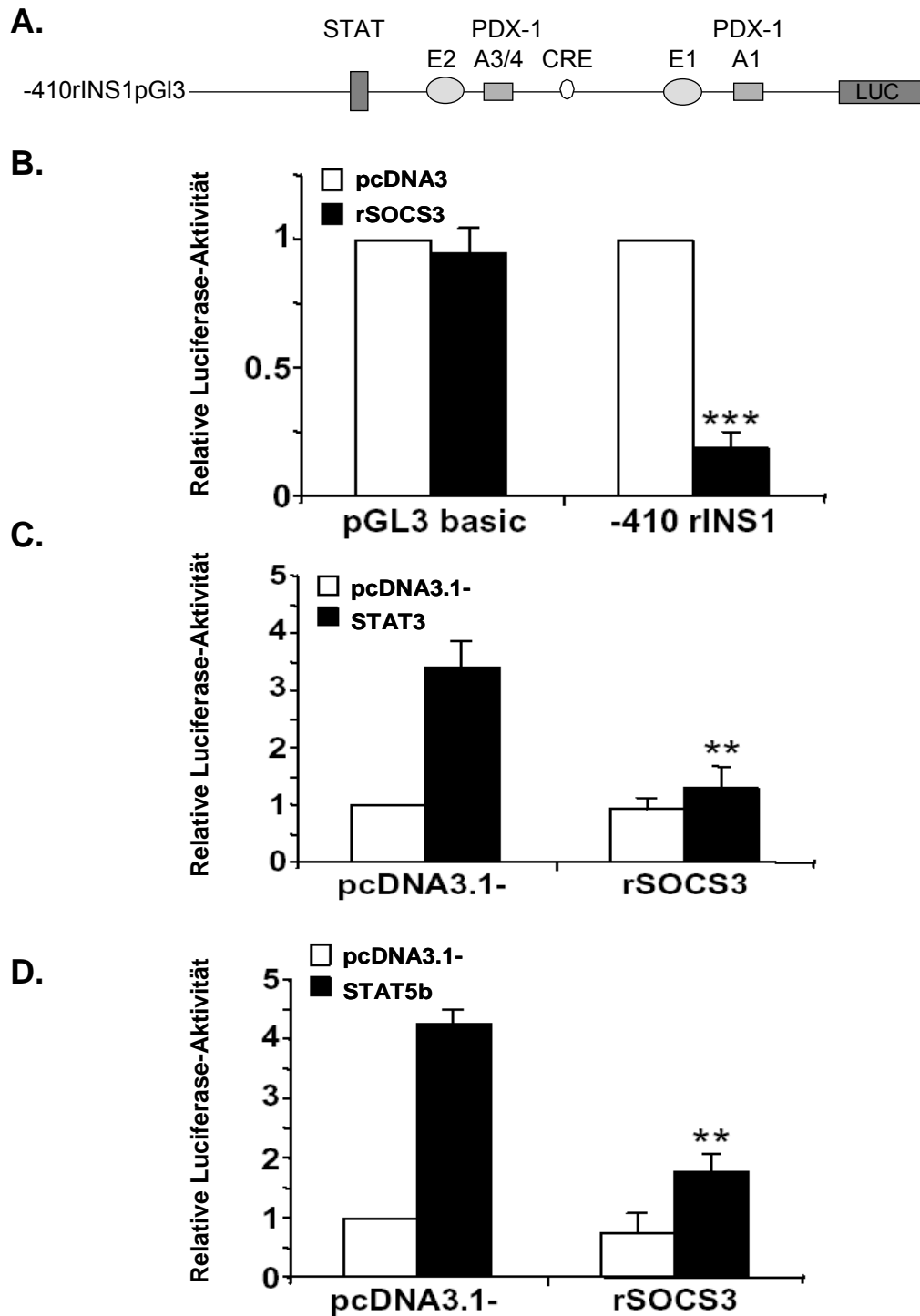


Abb. 3.12.: SOCS3 hemmt die basale, STAT3 und STAT5b vermittelte Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotors 1 in INS-1 Zellen. Luciferase-Reporter-gen Versuche mit INS-1 Zellen. **A.** Responsive Elemente im Promotor des Proinsulin-1-Gens der Ratte. **B.** Kotransfektion des Leervektors (pcDNA3) oder des rSOCS3 (rSOCS3pcDNA3) Expressionsvektors mit dem Luciferase-Reporter-gen -410rINS1pGI3 bzw. pGI3basic. **C.** Kotransfektion des Leervektors oder des rSOCS3 Expressionsvektors mit dem Luciferase-Reporter-gen -410rINS1pGI3, der durch Kotransfektion mit dem Expressionsplasmid für STAT3 (rSTAT3pcDNA3.1-) bzw. seinem Leervektor (pcDNA3.1-) aktiviert wurde. **D.** Kotransfektion des Leervektors oder des rSOCS3 Expressionsvektors mit dem Luciferase-Reporter-gen -410rINS1pGI3, der durch Kotransfektion mit dem Expressionsplasmid für STAT5b (rSTAT5bpcDNA3.1-) bzw. seinem Leervektor (pcDNA3.1-) aktiviert wurde. ** $p < 0.01$; *** $p < 0,001$. Jeweils 1,5 μg DNA des entsprechenden Expressionsplasmids und 1 μg DNA des entsprechenden Reporter-gen-Vektors.

4. Diskussion

4.1. Leptinsignalübertragung in Insulin produzierenden Zellen des endokrinen Pankreas

Leptin hemmt sowohl die Insulinsekretion (31, 35, 36) als auch die Insulinbiosynthese (34) in β -Zellen des endokrinen Pankreas, in denen die lange Form des Leptinrezeptors exprimiert wird. Insulin dagegen, als adipogenes Hormon, fördert die Leptinproduktion durch die Adipozyten (37-40). Diese Beobachtungen etablieren die Existenz der „Adipoinsulären Achse“ (Abb. 1.2.) (1, 41, 42), deren Fehlregulation mit für die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 verantwortlich ist. Auf Ebene des Hypothalamus fördert Leptin über spezifische Rezeptoren den Energieverbrauch und hemmt die Nahrungsaufnahme (18, 20-23). Bei adipösen Menschen, die per se erhöhte Plasmaspiegel von Leptin aufweisen, scheint dieser Regulationsmechanismus jedoch nicht mehr zu funktionieren, sodass eine Leptinresistenz postuliert wird (68). Auf Ebene des Hypothalamus bewirkt diese Leptinresistenz eine vermehrte Nahrungsaufnahme, Leptin scheint hier nicht in der Lage zu sein, diese zu hemmen. Auf Ebene der β -Zellen des endokrinen Pankreas könnte eine Leptinresistenz zu übermäßiger Insulinproduktion führen. Sowohl vermehrte Nahrungsaufnahme, als auch erhöhte Insulinspiegel können letztendlich zur Entwicklung bzw. Progression einer Adipositas und damit Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 führen (42, 128). Folglich ist es denkbar, dass Dysregulation der „Adipoinsulären Achse“ die Entwicklung einer Adipositas unabhängigen Hyperinsulinämie bewirkt (42, 128, 129). Aus diesem Grund ist es wichtig, die Leptin Signalübertragung in β -Zellen des endokrinen Pankreas näher zu untersuchen.

Strukturell gehört Leptin zu den Zytokinen (43). Seine Signalübertragung erfolgt über den Leptinrezeptor (OB-Rb), der zu der Klasse I der Zytokinrezeptoren gehört (44) und intrazellulär an den JAK-STAT-Signalübertragungsweg gekoppelt ist (49-51). In der Rattenzelllinie INS-1, einem Modell für β -Zellen des endokrinen Pankreas, die die lange Form des Leptinrezeptor (OB-Rb)

exprimiert (34), konnte mittels RT-PCR mit mRNA aus INS-1 Zellen und spezifischen Oligonukleotiden für die sieben bekannten signal transducer and activator of transcription (STAT), eine Expression für STAT1, STAT3, STAT5b und STAT6 nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass Bestandteile des JAK-STAT-Signalübertragungsweges, insbesondere STAT3 und STAT5b für die in anderen Geweben bereits eine Beteiligung bei der Leptinsignalübertragung gezeigt wurde (51, 54), in INS-1 Zellen vorhanden sind. Die INS-1 Zelllinie ist somit prinzipiell für detaillierte Untersuchungen der Leptinsignalübertragung geeignet sind. Eine Leptinresponsivität konnte bereits früher gezeigt werden (34, 130, 131).

Durch Immunpräzipitation und Western blot konnte in INS-1 Zellen nachgewiesen werden, dass Stimulation mit Leptin zu einer Rekrutierung von STAT3 und STAT5b an die Leptinrezeptor assoziierte Janus-Kinase 2 und zu einer konsekutiven Phosphorylierung von STAT3 und STAT5b führt (Abb.: 3.2.). Darüber hinaus translozieren STAT3 und STAT5b nach Stimulation mit Leptin in INS-1 Zellen zeitabhängig in den Kern (Abb.:3.3.). Zusammenfassend aktiviert Leptin in Insulin produzierenden Zellen STAT3 und STAT5b durch Tyrosinphosphorylierung über den JAK-STAT-Signalübertragungsweg.

In β -Zellen des endokrinen Pankreas scheinen somit STAT3 und STAT5b die Hauptfaktoren zu sein über die die Leptin vermittelte Signalübertragung über den JAK-STAT-Signalübertragungsweg erfolgt. STAT3 und STAT5b stellen folglich wichtige Transkriptionsfaktoren dar, über die Leptin die Expression verschiedener Gene in β -Zellen des endokrinen Pankreas reguliert. Diese Aussagen passen sehr gut zu Ergebnisse früherer Arbeiten, die speziell STAT3 als essentiell für die Regulation des Energiehaushaltes durch Leptin *in vivo* beschreiben (48, 132, 133).

4.2. Insulinpromotoraktivität

Leptin hemmt die Insulinbiosynthese über Hemmung der Proinsulingentranskription (34, 134). Es wird vermutet, dass hierbei STATs

direkt mit involviert sind und zwar über Bindung an das STAT responsive Element im Ratten-Insulingenpromotor 1. So konnte in einer früheren Arbeit von Seufert et al. (34) eine vermehrte Bindung von STAT5b an spezifische STAT responsive DNA-Bindungselemente im Ratten-Insulingenpromotor 1 (-410rINS1pGI3) unter dem Einfluss von Leptin gezeigt werden. Auch wenn STATs meist als Aktivatoren beschrieben werden (53, 55), gibt es Arbeiten, die STAT5b als Hemmer der Transkription beschreiben (135). In dieser Arbeit konnte in INS-1 Zellen mittels Luciferase-Reportergen Versuchen eine deutliche Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotor 1 durch STAT3 und STAT5b gezeigt werden (Abb. 3.4.), während Leptin diesen eindeutig hemmt (34). Dies weist darauf hin, dass die Hemmung der Insulinbiosynthese auf transkriptioneller Ebene nicht direkt durch STAT3 und STAT5b erfolgt. Es müssen vielmehr weitere Signalmoleküle involviert sein, die entweder über einen eigenständigen, unabhängigen Mechanismus agieren, oder aber zusammen mit STAT3 und STAT5b.

Diese Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotors 1 durch STAT3 und STAT5b erfolgt nicht ausschließlich über das STAT responsive Element, da die Promotoraktivität sowohl nach Deletion, als auch nach Mutation der bekannten STAT-Bindungsstelle unverändert bleibt. Erst nach Deletion des A3/4-Elements, der PDX-1 Bindungsstelle, ist eine starke Abnahme des Ratten-Insulingenpromotors 1 zu verzeichnen. Dies deutet auf eine funktionelle Interaktion von STAT5b und PDX-1 bei der Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotors 1 hin. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese funktionelle Interaktion von STAT5b und PDX-1 durch CBP/p300 verstärkt werden kann. Diese synergistische Interaktion bei der Aktivierung des Ratten-Insulinpromotors 1 ist jedoch unabhängig vom STAT-responsiven DNA-Element im Promotor. Sie ist vielmehr abhängig vom A3/4 Element, der PDX-1 Bindungsstelle, da erst bei Deletion des A3/4 Elementes diese synergistische Wirkung auf den Ratten-Insulingenpromotor 1 nicht mehr nachweisbar ist. Diese Daten passen in das bisherige Bild der Insulinpromotoraktivierung, die besagen, dass der Insulinpromotor nicht durch einen einzigen Proteinkomplex aktiviert wird, sondern durch eine Kombination verschiedener

Transkriptionsfaktoren (109, 110), wobei PDX-1 eine zentrale Rolle einnimmt. Für PDX-1 ist bereits mehrfach eine Interaktion mit dem Koaktivator CBP/p300 bei der Aktivierung des Insulinpromotors beschrieben (106-108), darüber hinaus wird sogar postuliert, dass eine Interaktion von PDX-1 und CBP/p300 nötig ist, damit PDX-1 seine Zielgene aktivieren kann (106, 108). Wie wichtig eine Interaktion von PDX-1 und CBP/p300 bei der Aktivierung des Insulinpromotors ist, wird auch daran deutlich, dass Mutationen in der Transaktivierungsdomäne von PDX-1 die Interaktionsfähigkeit von PDX-1 und CBP/p300 herabsetzten, was zu einer reduzierten Aktivierung des Insulinpromotors führt (106). Auch für STAT-Transkriptionsfaktoren, insbesondere für STAT5b, ist eine Interaktion mit CBP/p300 beschrieben (102-105), bisher jedoch nicht bei der Aktivierung des Insulinpromotors und auch nicht zusammen mit PDX-1. Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass CBP/p300 mit STAT5b und PDX-1 einen transkriptionellen Komplex bildet, der zu einer synergistischen Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotors 1 führt und abhängig vom A3/4 Element, der PDX-1 Bindungsstelle, ist. Diese Daten zeigen somit insbesondere für STAT5b eine neue Interaktionsmöglichkeit bei der Aktivierung des Ratten-Insulinpromotors 1 auf und tragen zum weiteren Verständnis der Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotors 1 bei, die durch komplexe Interaktionen verschiedener Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren erfolgt.

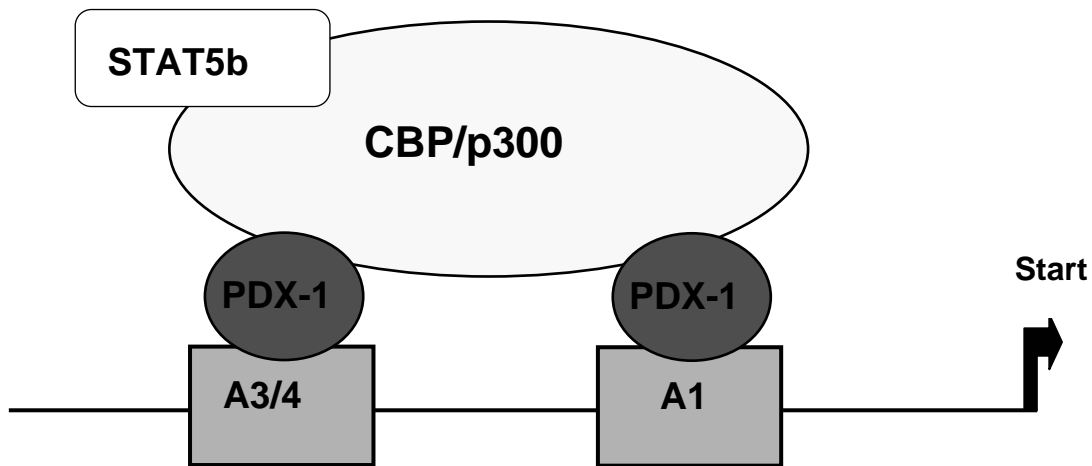


Abb.4.1.: Modell der Interaktion zwischen STAT5b, PDX-1 und CBP/p300 bei der Aktivierung des Ratten-Insulingenpromotors 1. PDX-1 bindet an die A-Elemente und bildet zusammen mit STAT5b und CBP/p300 einen transkriptionellen Komplex, durch den der Ratten-Insulingenpromotors 1 synergistisch aktiviert wird. CBP/p300 fungiert hierbei als Bindeglied zwischen STAT5b und PDX-1. Die Aktivierung ist unabhängig vom STAT responsiven Element.

4.3. Einfluss von SOCS3 auf die Insulinpromotoraktivität

STAT3 und STAT5b scheinen die Hauptfaktoren zu sein, über die Leptin die Expression verschiedenen Gene in pankreatischen β -Zellen reguliert. Wie in Abbildung 3.4. gezeigt, aktivieren sie den Ratten-Insulingenpromotor 1 (Abb.3.4.), während Leptin diesen eindeutig hemmt. Diese Hemmung ist mit einer gesteigerten Bindung von STAT5b an STAT responsive Elemente im 410 bp langen Ratten-Insulinpromotor verbunden (34), was darauf hindeutet, dass weitere Signalmoleküle involviert sein müssen über die die Leptin vermittelte Hemmung der Insulintranskription erfolgt. Es gibt negative Regulatoren der JAK-STAT Signalübertragung, nämlich Moleküle aus der Familie der Suppressors of Cytokine Signalling (SOCS). Ihre Expression wird durch Zytokine, zu denen Leptin zählt, induziert (56, 57, 59, 65). Im SOCS3 Promotor sind drei STAT Bindungsstellen bekannt und die Zytokin induzierte Expression der SOCS Proteine erfolgt über STATs (67). Im Hypothalamus konnte bereits gezeigt werden, dass die periphere Gabe von Leptin zur Expression von SOCS3 in *ob/ob* Mäusen führt und zwar in Regionen, in denen die lange Form des Leptinrezeptors vorhanden ist (24, 68). Ähnliche Ergebnisse konnten in der

Agouti Maus, einem Mausmodell, das durch Hyperleptinämie und Leptinresistenz gekennzeichnet ist, generiert werden (68). In 293 Zellen, die mit dem Leptinrezeptor transfiziert waren, konnte gezeigt werden, dass Leptin die Expression von SOCS3 über STAT3 bewirkt. SOCS3 bindet in Folge an die Leptinrezeptor assoziierte Janus-Kinase 2, antagonisiert auf diesem Weg die Aktivität von JAK2 und hemmt somit die proximale Leptinsignalübertragung über den JAK-STAT-Signalübertragungsweg (70). Zusätzlich konnte in neuronalen, zell-spezifischen SOCS3 *knock-out* Mäusen eine verminderte Nahrungsaufnahme und verbesserte Leptin- und Insulinresistenz (72) gezeigt werden. Ähnlich Ergebnisse konnten ebenfalls *in vivo* in für SOCS3 haploinsuffizienten Mäusen gewonnen werden (73). Aus diesen Gründen lag die Vermutung nahe, dass SOCS Moleküle auch in pankreatischen β -Zellen eine Schlüsselrolle in der Leptin vermittelten Hemmung der Insulinpromotoraktivität einnehmen.

Analog zu den Daten aus dem Hypothalamus, wird auch in β -Zellen des endokrinen Pankreas zeitabhängig nach Stimulation mit Leptin SOCS3 mRNA exprimiert. Eine Zeitabhängigkeit konnte in INS-1 Zellen zwar nicht gezeigt werden (Abb. 3.9.), jedoch wurde in einer kurz vor der Veröffentlichung stehenden Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe mittels semiquantitativen RT-PCR in Pankreas-Inseln von *ob/ob*-Mäusen *in vivo* ein 3-facher Anstieg der SOCS3-Expression 12 h nach Stimulation mit Leptin nachgewiesen. Dies konnte auf transkriptioneller Ebene bestätigt werden. Die Steigerung der transkriptionellen Aktivität wird über STAT3 und STAT5b vermittelt, die an spezifische STAT responsive Regulatorelemente im SOCS3 Promotor binden (Abb.3.11.).

Zusammenfassend kann an dieser Stelle der Schluss gezogen werden, dass SOCS3 in β -Zellen des endokrinen Pankreas ein durch Leptin induziertes Signalmolekül ist, dessen Expression durch Leptin über Aktivierung von STAT3 und STAT5b stimuliert wird.

Die Hypothese, dass SOCS3 als Signalmolekül in den pankreatischen β -Zellen eine wichtige Rolle einnimmt wird weiterhin dadurch bestätigt, dass sowohl die basale als auch die STAT3 und STAT5b stimulierte Aktivität des 410 bp langen Ratten-Insulingenpromotors 1 durch SOCS3 gehemmt wird. Diese Suppression

der basalen und STAT vermittelten Insulingen Expression in pankreatischen β -Zellen erfolgt über Hemmung des JAK-STAT Signalübertragungsweges. Am ehesten erfolgt dies über Konkurrenz von STATs und SOCS3 um die Bindungsstelle an der Janus-Kinase 2 des Leptinrezeptors. Folglich ist SOCS3 auch in β -Zellen des endokrinen Pankreas zum einen ein Leptin induzierter negativer Regulator der proximalen Signalübertragung von Leptin, im Sinne eines autoregulatorischen Feedbacks. Zum anderen ist SOCS3 ein wichtiger Mediator der Leptin abhängigen Signalübertragung über den JAK-STAT Signalübertragungsweg.

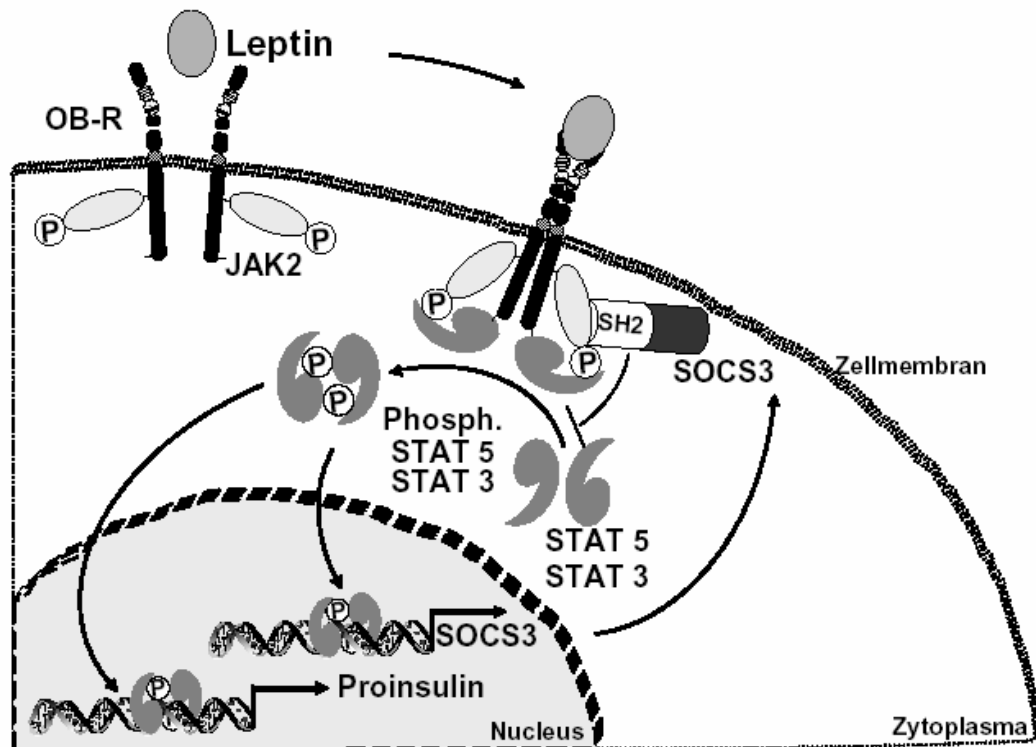


Abb.4.2.: Modell der Signalübertragung und Genregulation von Leptin in β -Zellen des endokrinen Pankreas. Leptin bindet an seinen Rezeptor, anschließend wird die Rezeptor assoziierte Janus-Kinase 2 (JAK2) durch Transphosphorylierung aktiviert und phosphoryliert Tyrosinreste des zytosolischen Anteils des Leptinrezeptors. STAT3 und STAT5b können nun an den Leptinrezeptor rekrutiert werden und ebenfalls über JAK2 phosphoryliert werden. Die phosphorylierten STATs dimerisieren und translokieren in den Zellkern. STAT3 und STAT5b aktivieren nun sowohl den SOCS3 als auch den Insulinpromotor. SOCS3 hemmt als negatives Feedback den JAK-STAT Signalübertragungsweg über Bindung an den Tyrosin phosphorylierten Leptinrezeptor und verhindert somit, daß STATs daran binden können. Modifiziert nach Seufert (1).

Ob SOCS3 im Hypothalamus oder den pankreatischen β -Zellen eine zusätzliche Rolle in weiter distalen Bereichen der JAK-STAT-Signalübertragung spielt, ist bisher nicht bekannt. Weitere Untersuchungen diesbezüglich werden erfolgen müssen, vor allem auch angesichts der Tatsache, dass SOCS3 ein essentieller Kandidat im Rahmen der Leptinresistenz ist (24, 68) und SOCS3 Inhibitoren als Therapeutika zur Behandlung bzw. Verbesserung der Leptinresistenz und damit der Adipositas gehandelt werden (72, 73, 136).

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit ein Molekularer Mechanismus beschrieben über den Leptin die Insulinen Expression und konsekutiv die Insulinbiosynthese und –sekretion hemmt. SOCS3 nimmt somit in Bezug auf die Leptinwirkungen in den β -Zellen des endokrinen Pankreas eine Schlüsselposition ein. Diese Ergebnisse tragen zum besseren molekularen Verständnis der hemmenden Wirkung von Leptin auf die Insulinproduktion im Rahmen der Adipoinsulären Achse bei und liefern neue Einsichten in die Entwicklung einer β -Zell Dysfunktion im Verlauf eines Diabetes mellitus Typ 2. Abgeschwächte Signalübertragung über den JAK-STAT Signalübertragungsweg, bedingt durch SOCS3, führt somit zu Hyperinsulinämie, assoziiert mit der Entwicklung eines Metabolischen Syndroms und Diabetes mellitus Typ 2.

5. Zusammenfassung

Das Fettgewebshormon Leptin hemmt in β -Zellen des endokrinen Pankreas die Insulinbiosynthese und -sekretion. Insulin dagegen als adipogenes Hormon fördert die Leptinproduktion, so dass ein Regelkreis, die so genannte "Adipoinsuläre Achse" entsteht. Fehlregulationen dieser Achse werden vor allem bei übergewichtigen Menschen mit einer Hyperleptinämie im Rahmen der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 diskutiert. Die genauen molekularen Mechanismen über die die transkriptionellen Effekte von Leptin auf die Proinsulinen Expression erfolgen sind bis dato nicht ausreichend verstanden. Die Signalübertragung von Leptin erfolgt über den JAK-STAT-Signalübertragungsweg. Dieser Signalübertragungsweg kann durch Moleküle aus der Familie der Suppressors of Cytokine Signalling (SOCS) gehemmt werden. Ziel dieser Arbeit war die Leptin vermittelte Signaltransduktion in β -Zellen des endokrinen Pankreas sowie die Insulinen Expression näher zu charakterisieren. Stimulation mit Leptin führt zu einer JAK2 abhängigen Phosphorylierung und zeitabhängigen nukleären Translokation von STAT3 und STAT5b in INS-1 Zellen. Sowohl STAT3 als auch STAT5b aktivieren den Proinsulinen Promotor in INS-1 Zellen. Für STAT5b konnte in INS-1 Zellen gezeigt werden, dass diese Aktivierung durch Interaktion mit PDX-1, dem zentralen Regulator der β -Zelldifferenzierung und -funktion, und Koaktivator CBP/p300 erfolgt. Diese synergistische Aktivierung ist abhängig von der PDX-1 Bindungsstelle, dem A3/A4 Element im Ratten-Insulinenpromotor 1.

Weiterhin konnte in INS-1 Zellen *in vitro* gezeigt werden, dass Leptin die mRNA Expression von SOCS3 induziert. Eine Aktivierung des Ratten SOCS3 Promotors konnte sowohl durch Leptin, als auch durch STAT3 und STAT5b nachgewiesen werden. Diese Aktivierung erfolgt über spezifische Bindung von STAT3 und STAT5b an bekannte STAT-Bindungsstellen im SOCS3 Promotor, was durch EMSAs mit Kernextrakten von INS-1 Zellen demonstriert werden konnte. SOCS3 wiederum hemmt sowohl die basale als auch die STAT3 und STAT5b vermittelte Aktivierung des Ratten-Insulinpromotors 1 in INS-1 Zellen. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass SOCS3 ein Leptin

induzierter Inhibitor der Proinsulinen Expression in pankreatischen β -Zellen ist, im Sinne einer negativen Rückkoppelung. SOCS3 ist somit ein direkter Vermittler der Leptin Signalübertragung distal von JAK-STAT in β -Zellen des endokrinen Pankreas.

6. Literaturverzeichnis

1. **Seufert J** 2004 Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes* 53 Suppl 1:S152-8
2. **Seufert J** 1999 [The significance of leptin for the pathogenesis of diabetes mellitus type 2. Direct effects on endocrine pancreas]. *Internist (Berl)* 40:894-7
3. **Atkinson MA, Maclaren NK** 1994 The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 331:1428-36
4. 1997 Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20:1183-97
5. **DeFronzo RA** 1988 Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 37:667-87
6. **Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Haring HU** 2000 Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocr Rev* 21:585-618
7. **DeFronzo RA, Ferrannini E** 1991 Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14:173-94
8. **Manson JE, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Krolewski AS, Rosner B, Hennekens CH, Speizer FE** 1991 Physical activity and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. *Lancet* 338:774-8
9. **King H, Aubert RE, Herman WH** 1998 Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21:1414-31
10. **Ferrannini E** 1998 Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev* 19:477-90
11. **Gerich JE** 1998 The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* 19:491-503
12. **Hauner H, Scherbaum WA** 2002 [Diabetes mellitus type 2]. *Dtsch Med Wochenschr* 127:1003-5
13. **Hauner H** 1998 [Occurrence of diabetes mellitus in Germany]. *Dtsch Med Wochenschr* 123:777-82
14. **Janka HU, Michaelis D** 2002 [Epidemiology of diabetes mellitus: prevalence, incidence, pathogenesis, and prognosis]. *Z Arztl Fortbild Qualitatssich* 96:159-65
15. **Colditz GA, Willett WC, Rotnitzky A, Manson JE** 1995 Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. *Ann Intern Med* 122:481-6
16. **Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Manson JE, Hennekens CH, Arky RA, Speizer FE** 1990 Weight as a risk factor for clinical diabetes in women. *Am J Epidemiol* 132:501-13

17. **Meisinger C, Thorand B, Schneider A, Stieber J, Doring A, Lowel H** 2002 Sex differences in risk factors for incident type 2 diabetes mellitus: the MONICA Augsburg cohort study. *Arch Intern Med* 162:82-9
18. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM** 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-32
19. **Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL** 1996 Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334:292-5
20. **Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS** 1996 Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382:250-2
21. **Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P** 1995 Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269:546-9
22. **Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM** 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543-6
23. **Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F** 1995 Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269:540-3
24. **Bjorbaek C, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS** 1999 The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J Biol Chem* 274:30059-65
25. **Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF** 1996 The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes* 45:992-4
26. **Considine RV, Considine EL, Williams CJ, Nyce MR, Magosin SA, Bauer TL, Rosato EL, Colberg J, Caro JF** 1995 Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity. *J Clin Invest* 95:2986-8
27. **Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME** 1997 Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 275:88-90
28. **Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR** 1998 Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281:1683-6
29. **Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, Snodgrass HR** 1996 Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med* 2:585-9
30. **Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G** 2002 Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111:305-17
31. **Fehmann HC, Berghofer P, Brandhorst D, Brandhorst H, Hering B, Bretzel RG, Goke B** 1997 Leptin inhibition of insulin secretion from isolated human islets. *Acta Diabetol* 34:249-52

32. **Muzzin P, Eisensmith RC, Copeland KC, Woo SL** 1996 Correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by leptin gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14804-8
33. **Weigle DS, Bukowski TR, Foster DC, Holderman S, Kramer JM, Lasser G, Lofton-Day CE, Prunkard DE, Raymond C, Kuijper JL** 1995 Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J Clin Invest* 96:2065-70
34. **Seufert J, Kieffer TJ, Habener JF** 1999 Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:674-9
35. **Seufert J, Kieffer TJ, Leech CA, Holz GG, Moritz W, Ricordi C, Habener JF** 1999 Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 84:670-6
36. **Fehmann HC, Peiser C, Bode HP, Stamm M, Staats P, Hedetoft C, Lang RE, Goke B** 1997 Leptin: a potent inhibitor of insulin secretion. *Peptides* 18:1267-73
37. **Koopmans SJ, Frolich M, Gribnau EH, Westendorp RG, DeFronzo RA** 1998 Effect of hyperinsulinemia on plasma leptin concentrations and food intake in rats. *Am J Physiol* 274:E998-E1001
38. **Saad MF, Khan A, Sharma A, Michael R, Riad-Gabriel MG, Boyadjian R, Jinagouda SD, Steil GM, Kamdar V** 1998 Physiological insulinemia acutely modulates plasma leptin. *Diabetes* 47:544-9
39. **Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J** 1995 Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377:527-9
40. **Utriainen T, Malmstrom R, Makimattila S, Yki-Jarvinen H** 1996 Supraphysiological hyperinsulinemia increases plasma leptin concentrations after 4 h in normal subjects. *Diabetes* 45:1364-6
41. **Kieffer TJ, Heller RS, Habener JF** 1996 Leptin receptors expressed on pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 224:522-7
42. **Kieffer TJ, Habener JF** 2000 The adipoinular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E1-E14
43. **Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, DiMarchi RD, Furman TC, Hale JE, Hsiung HM, Schoner BE, Smith DP, Zhang XY, Wery JP, Schevitz RW** 1997 Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 387:206-9
44. **Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J** 1995 Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263-71
45. **Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM** 1996 Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379:632-5
46. **Flier JS** 1997 Leptin expression and action: new experimental paradigms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4242-5
47. **Baumann H, Morella KK, White DW, Dembski M, Bailon PS, Kim H, Lai CF, Tartaglia LA** 1996 The full-length leptin receptor has signaling

- capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8374-8
48. **Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC** 1996 Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6231-5
49. **Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE, Jr., Stoffel M, Friedman JM** 1996 Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* 14:95-7
50. **White DW, Kuropatwinski KK, Devos R, Baumann H, Tartaglia LA** 1997 Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization. *J Biol Chem* 272:4065-71
51. **Rosenblum CI, Tota M, Cully D, Smith T, Collum R, Qureshi S, Hess JF, Phillips MS, Hey PJ, Vongs A, Fong TM, Xu L, Chen HY, Smith RG, Schindler C, Van der Ploeg LH** 1996 Functional STAT 1 and 3 signaling by the leptin receptor (OB-R); reduced expression of the rat fatty leptin receptor in transfected cells. *Endocrinology* 137:5178-81
52. **Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA, Morton NM, Davenport M** 1997 Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* 46:313-6
53. **Ihle JN** 1996 STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84:331-4
54. **Bjorbaek C, Uotani S, da Silva B, Flier JS** 1997 Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem* 272:32686-95
55. **Darnell JE, Jr.** 1997 STATs and gene regulation. *Science* 277:1630-5
56. **Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ** 1997 A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387:917-21
57. **Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K, Akira S, Kishimoto T** 1997 Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 387:924-9
58. **Matsumoto A, Masuhara M, Mitsui K, Yokouchi M, Ohtsubo M, Misawa H, Miyajima A, Yoshimura A** 1997 CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* 89:3148-54
59. **Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiya S, Yoshimura A** 1997 A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387:921-4
60. **Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Sprigg NS, Starr R, Nicholson SE, Metcalf D, Nicola NA** 1998 Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:114-9

61. **Starr R, Hilton DJ** 1998 SOCS: suppressors of cytokine signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 30:1081-5
62. **Aman MJ, Leonard WJ** 1997 Cytokine signaling: cytokine-inducible signaling inhibitors. *Curr Biol* 7:R784-8
63. **Narazaki M, Fujimoto M, Matsumoto T, Morita Y, Saito H, Kajita T, Yoshizaki K, Naka T, Kishimoto T** 1998 Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13130-4
64. **Krebs DL, Hilton DJ** 2000 SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci* 113 (Pt 16):2813-9
65. **Yoshimura A, Ohkubo T, Kiguchi T, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Hara T, Miyajima A** 1995 A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *Embo J* 14:2816-26
66. **Minamoto S, Ikegame K, Ueno K, Narazaki M, Naka T, Yamamoto H, Matsumoto T, Saito H, Hosoe S, Kishimoto T** 1997 Cloning and functional analysis of new members of STAT induced STAT inhibitor (SSI) family: SSI-2 and SSI-3. *Biochem Biophys Res Commun* 237:79-83
67. **Auernhammer CJ, Bousquet C, Melmed S** 1999 Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6964-9
68. **Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS** 1998 Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell* 1:619-25
69. **Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C** 2004 Region-Specific Leptin Resistance within the Hypothalamus of Diet-Induced-Obese Mice. *Endocrinology*
70. **Bjorbak C, Lavery HJ, Bates SH, Olson RK, Davis SM, Flier JS, Myers MG, Jr.** 2000 SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J Biol Chem* 275:40649-57
71. **Tups A, Ellis C, Moar KM, Logie TJ, Adam CL, Mercer JG, Klingenspor M** 2004 Photoperiodic regulation of leptin sensitivity in the Siberian hamster, *Phodopus sungorus*, is reflected in arcuate nucleus SOCS-3 (suppressor of cytokine signaling) gene expression. *Endocrinology* 145:1185-93
72. **Mori H, Hanada R, Hanada T, Aki D, Mashima R, Nishinakamura H, Torisu T, Chien KR, Yasukawa H, Yoshimura A** 2004 Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nat Med* 10:739-43
73. **Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzamei I, Bjorbaek C, Flier JS** 2004 Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat Med* 10:734-8
74. **Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T** 1993 IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *Embo J* 12:4251-9
75. **Miller CP, McGehee RE, Jr., Habener JF** 1994 IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and

- duodenum that transactivates the somatostatin gene. *Embo J* 13:1145-56
76. **Leonard J, Peers B, Johnson T, Ferreri K, Lee S, Montminy MR** 1993 Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Mol Endocrinol* 7:1275-83
77. **Perez-Villamil B, Schwartz PT, Vallejo M** 1999 The pancreatic homeodomain transcription factor IDX1/IPF1 is expressed in neural cells during brain development. *Endocrinology* 140:3857-60
78. **McKinnon CM, Docherty K** 2001 Pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia* 44:1203-14
79. **Lu M, Miller C, Habener JF** 1996 Functional regions of the homeodomain protein IDX-1 required for transactivation of the rat somatostatin gene. *Endocrinology* 137:2959-67
80. **Habener JF, Stoffers DA** 1998 A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Proc Assoc Am Physicians* 110:12-21
81. **Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H** 1994 Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371:606-9
82. **Kemp DM, Thomas MK, Habener JF** 2003 Developmental aspects of the endocrine pancreas. *Rev Endocr Metab Disord* 4:5-17
83. **Fernandes A, King LC, Guz Y, Stein R, Wright CV, Teitelman G** 1997 Differentiation of new insulin-producing cells is induced by injury in adult pancreatic islets. *Endocrinology* 138:1750-62
84. **Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H** 1998 beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ip1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev* 12:1763-8
85. **German MS, Wang J** 1994 The insulin gene contains multiple transcriptional elements that respond to glucose. *Mol Cell Biol* 14:4067-75
86. **Olson LK, Sharma A, Peshavaria M, Wright CV, Towle HC, Rodertson RP, Stein R** 1995 Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9127-31
87. **Sharma A, Olson LK, Robertson RP, Stein R** 1995 The reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to high glucose concentration is associated with the loss of RIPE3b1 and STF-1 transcription factor expression. *Mol Endocrinol* 9:1127-34
88. **Waeber G, Thompson N, Nicod P, Bonny C** 1996 Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Mol Endocrinol* 10:1327-34
89. **Watada H, Kajimoto Y, Umayahara Y, Matsuoka T, Kaneto H, Fujitani Y, Kamada T, Kawamori R, Yamasaki Y** 1996 The human glucokinase gene beta-cell-type promoter: an essential role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells. *Diabetes* 45:1478-88

90. **Serup P, Jensen J, Andersen FG, Jorgensen MC, Blume N, Holst JJ, Madsen OD** 1996 Induction of insulin and islet amyloid polypeptide production in pancreatic islet glucagonoma cells by insulin promoter factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9015-20
91. **Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF** 1997 Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 17:138-9
92. **Chrivia JC, Kwok RP, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR, Goodman RH** 1993 Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* 365:855-9
93. **Eckner R, Ewen ME, Newsome D, Gerdes M, DeCaprio JA, Lawrence JB, Livingston DM** 1994 Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev* 8:869-84
94. **Eckner R** 1996 p300 and CBP as transcriptional regulators and targets of oncogenic events. *Biol Chem* 377:685-8
95. **Lee JS, See RH, Deng T, Shi Y** 1996 Adenovirus E1A downregulates cJun- and JunB-mediated transcription by targeting their coactivator p300. *Mol Cell Biol* 16:4312-26
96. **Stein RW, Whelan J** 1989 Insulin gene enhancer activity is inhibited by adenovirus 5 E1a gene products. *Mol Cell Biol* 9:4531-4
97. **Arias J, Alberts AS, Brindle P, Claret FX, Smeal T, Karin M, Feramisco J, Montminy M** 1994 Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* 370:226-9
98. **Lee JS, Zhang X, Shi Y** 1996 Differential interactions of the CREB/ATF family of transcription factors with p300 and adenovirus E1A. *J Biol Chem* 271:17666-74
99. **Eckner R, Yao TP, Oldread E, Livingston DM** 1996 Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation. *Genes Dev* 10:2478-90
100. **Mutoh H, Naya FJ, Tsai MJ, Leiter AB** 1998 The basic helix-loop-helix protein BETA2 interacts with p300 to coordinate differentiation of secretin-expressing enteroendocrine cells. *Genes Dev* 12:820-30
101. **Sharma A, Moore M, Marcora E, Lee JE, Qiu Y, Samaras S, Stein R** 1999 The NeuroD1/BETA2 sequences essential for insulin gene transcription colocalize with those necessary for neurogenesis and p300/CREB binding protein binding. *Mol Cell Biol* 19:704-13
102. **Bhattacharya S, Eckner R, Grossman S, Oldread E, Arany Z, D'Andrea A, Livingston DM** 1996 Cooperation of Stat2 and p300/CBP in signalling induced by interferon-alpha. *Nature* 383:344-7
103. **Paulson M, Pisharody S, Pan L, Guadagno S, Mui AL, Levy DE** 1999 Stat protein transactivation domains recruit p300/CBP through widely divergent sequences. *J Biol Chem* 274:25343-9
104. **Pfizner E, Jahne R, Wissler M, Stoecklin E, Groner B** 1998 p300/CREB-binding protein enhances the prolactin-mediated transcriptional induction through direct interaction with the transactivation domain of Stat5, but does not participate in the Stat5-mediated suppression of the glucocorticoid response. *Mol Endocrinol* 12:1582-93

105. **Zhang JJ, Vinkemeier U, Gu W, Chakravarti D, Horvath CM, Darnell JE, Jr.** 1996 Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15092-6
106. **Stanojevic V, Habener JF, Thomas MK** 2004 Pancreas duodenum homeobox-1 transcriptional activation requires interactions with p300. *Endocrinology* 145:2918-28
107. **Ohneda K, Mirmira RG, Wang J, Johnson JD, German MS** 2000 The homeodomain of PDX-1 mediates multiple protein-protein interactions in the formation of a transcriptional activation complex on the insulin promoter. *Mol Cell Biol* 20:900-11
108. **Qiu Y, Guo M, Huang S, Stein R** 2002 Insulin gene transcription is mediated by interactions between the p300 coactivator and PDX-1, BETA2, and E47. *Mol Cell Biol* 22:412-20
109. **Melloul D, Marshak S, Cerasi E** 2002 Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45:309-26
110. **Sander M, German MS** 1997 The beta cell transcription factors and development of the pancreas. *J Mol Med* 75:327-40
111. **Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, Weintraub H** 1995 Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268:836-44
112. **Mutoh H, Fung BP, Naya FJ, Tsai MJ, Nishitani J, Leiter AB** 1997 The basic helix-loop-helix transcription factor BETA2/NeuroD is expressed in mammalian enteroendocrine cells and activates secretin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3560-4
113. **Naya FJ, Huang HP, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo FJ, Leiter AB, Tsai MJ** 1997 Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. *Genes Dev* 11:2323-34
114. **Naya FJ, Stellrecht CM, Tsai MJ** 1995 Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev* 9:1009-19
115. **Galsgaard ED, Gouilleux F, Groner B, Serup P, Nielsen JH, Billestrup N** 1996 Identification of a growth hormone-responsive STAT5-binding element in the rat insulin 1 gene. *Mol Endocrinol* 10:652-60
116. **Peers B, Leonard J, Sharma S, Teitelman G, Montminy MR** 1994 Insulin expression in pancreatic islet cells relies on cooperative interactions between the helix loop helix factor E47 and the homeobox factor STF-1. *Mol Endocrinol* 8:1798-806
117. **Peshavaria M, Henderson E, Sharma A, Wright CV, Stein R** 1997 Functional characterization of the transactivation properties of the PDX-1 homeodomain protein. *Mol Cell Biol* 17:3987-96
118. **Serup P, Petersen HV, Pedersen EE, Edlund H, Leonard J, Petersen JS, Larsson LI, Madsen OD** 1995 The homeodomain protein IPF-1/STF-1 is expressed in a subset of islet cells and promotes rat insulin 1 gene expression dependent on an intact E1 helix-loop-helix factor binding site. *Biochem J* 310 (Pt 3):997-1003
119. **German MS, Wang J, Chadwick RB, Rutter WJ** 1992 Synergistic activation of the insulin gene by a LIM-homeo domain protein and a basic

- helix-loop-helix protein: building a functional insulin minienhancer complex. *Genes Dev* 6:2165-76
120. **Thomas MK, Yao KM, Tenser MS, Wong GG, Habener JF** 1999 Bridge-1, a novel PDZ-domain coactivator of E2A-mediated regulation of insulin gene transcription. *Mol Cell Biol* 19:8492-504
 121. **Qiu Y, Sharma A, Stein R** 1998 p300 mediates transcriptional stimulation by the basic helix-loop-helix activators of the insulin gene. *Mol Cell Biol* 18:2957-64
 122. **Asfari M, Janjic D, Meda P, Li G, Halban PA, Wollheim CB** 1992 Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* 130:167-78
 123. **Brasier AR, Tate JE, Habener JF** 1989 Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. *Biotechniques* 7:1116-22
 124. **Chomczynski P, Sacchi N** 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9
 125. **Inoue H, Nojima H, Okayama H** 1990 High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-8
 126. **Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W** 1989 Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17:6419
 127. **Bradford MM** 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54
 128. **Lakka HM, Oksanen L, Tuomainen TP, Kontula K, Salonen JT** 2000 The common pentanucleotide polymorphism of the 3'-untranslated region of the leptin receptor gene is associated with serum insulin levels and the risk of type 2 diabetes in non-diabetic men: a prospective case-control study. *J Intern Med* 248:77-83
 129. **Ishikawa M, Pruneda ML, Adams-Huet B, Raskin P** 1998 Obesity-independent hyperinsulinemia in nondiabetic first-degree relatives of individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 47:788-92
 130. **Ahren B, Havel PJ** 1999 Leptin inhibits insulin secretion induced by cellular cAMP in a pancreatic B cell line (INS-1 cells). *Am J Physiol* 277:R959-66
 131. **Lam NT, Cheung AT, Riedel MJ, Light PE, Cheeseman CI, Kieffer TJ** 2004 Leptin reduces glucose transport and cellular ATP levels in INS-1 beta-cells. *J Mol Endocrinol* 32:415-24
 132. **Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz MW, Myers MG, Jr.** 2003 STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 421:856-9
 133. **Gao Q, Wolfgang MJ, Neschen S, Morino K, Horvath TL, Shulman GI, Fu XY** 2004 Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4661-6

134. **Kulkarni RN, Wang ZL, Wang RM, Hurley JD, Smith DM, Ghatel MA, Withers DJ, Gardiner JV, Bailey CJ, Bloom SR** 1997 Leptin rapidly suppresses insulin release from insulinoma cells, rat and human islets and, in vivo, in mice. *J Clin Invest* 100:2729-36
135. **Luo G, Yu-Lee L** 2000 Stat5b inhibits NFkappaB-mediated signaling. *Mol Endocrinol* 14:114-23
136. **Myers MG, Jr.** 2004 Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Prog Horm Res* 59:287-304

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich besonders bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. J. Seufert bedanken, der es mir ermöglichte diese Arbeit anzufertigen und mir stets durch seine ausgezeichnete, lehrreiche und engagierte Betreuung zur Seite stand, mich mit wertvoller konstruktiver Kritik inhaltlich begleitete und mir mehrfach die Möglichkeit gab, Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen vorzustellen. Bis heute kann er mich sowohl für die experimentelle als auch klinische Endokrinologie motivieren und begeistern und ist mir ein wichtiger medizinischer Lehrer geworden.

Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. F. Jakob, der durch viele Diskussionen und Ideen zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Hormonlabors der Medizinischen Poliklinik für die exzellente Arbeitsatmosphäre und Unterstützung sowie Versorgung in allen Lebenslagen. Ohne Euch würde das Arbeiten im Labor bei weitem nicht so viel Spaß machen. Besonders erwähnt seien Frau Luitgard Kraus und Frau Jeanette Roller.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. rer. nat. Günter Päth, der mir in vielen aktuellen Fragestellungen mit Rat und Tat zur Seite steht und insbesondere in computertechnischen Fragen fast immer eine Lösung findet.

Schließlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. K. Wilms bedanken, dass ich diese Arbeit an seiner Klinik anfertigen durfte und dort, auch unter seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. med. H. Einsele, die Möglichkeit habe eine hochwertige klinische Ausbildung in Innerer Medizin erfahren zu dürfen.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern und Brüdern, sowie meinen engsten Freunden, auf die ich mich all die Jahre verlassen konnte und deren Meinung mir immer wichtig war. Eure Unterstützung und euren Rückhalt weiß ich sehr zu schätzen.

Persönliche Daten

Name: Katharina Franziska Laubner
Geburtsdatum: 10.10.1976
Geburtsort: Pforzheim
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1982-86 Grundschule Dörzbach
1986-95 Deutschorden-Gymnasium Bad Mergentheim
29.06.1995 Allgemeine Hochschulreife

Studium

Studienfach: Humanmedizin
WS 1995/96-SS 1997 Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
WS 1997/98 Leopold-Franzens-Universität Innsbruck
SS 1998 Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
WS 1998/99-SS 2002 Julius-Maximilians-Universität Würzburg
April 2001-März 2002 Praktisches Jahr:
- Universitäts-Frauenklinik Würzburg
- Kantonsspital Basel / Innere Medizin
- Juliusspital Würzburg / Chirurgie
09/1997 Ärztliche Vorprüfung
09/1998 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2001 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2002 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
16.12.2003 Approbation als Ärztin

Beruflicher Werdegang:

16.06.2002 – 15.12.2003 Ärztin im Praktikum an der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg, Innere Medizin
seit 16.12.2003 Assistenzärztin an der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg (Direktor: Prof. Dr. med. K. Wilms, seit 16.12.2004 Prof. Dr. med. H. Einsele)

Würzburg, den 13.09.2005

Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit folgenden Preisen und Auszeichnungen gewürdigt:

2000	Travel Grant Award der Endocrine Society, USA. (Meeting in Toronto, Canada)
2000	Posterpreis Jahrestagung der Sektion Neuroendokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, München
2001	Travel and Stayment Grant VIIIth International Symposium on Insulin Receptors and Insulin Action; Geneva
2001	Merck Senior Fellows Award (Endocrine Society Meeting in Denver, Colorado)
2003	3. Preis des Young Investigator's Award Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2003 in Wiesbaden
2004	Medical Student Achievement Award der Endocrine Society, USA

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

1. **Katharina Laubner**, Timothy J. Kieffer, Ni T. Lam, Xinjie Niu, Franz Jakob and Jochen Seufert. Inhibition of Preproinsulin Gene Expression by Leptin Induction of Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3) in Pancreatic Beta Cells. Leptin Mediated Signal Transduction and Proinsulin Gene
Accepted for Publication in Diabetes

Abstracta

1. Seufert, J., **K. Laubner** and F. Jakob. 2000. Regulation der Proinsulin-Genexpression durch den Transkriptionsfaktor STAT5B. *Med.Klin.* 95(Abstrakt-Band I):98 (Abstr.) (Poster)

-
2. Seufert, J., **K. Laubner** and F.Jakob.2000. Signaling and gene regulation by Leptin in pancreatic beta-cells involves suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3). *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes*.108(Suppl.1):S8 (Abstr.) (Vortrag)
 3. Seufert, J., **K. Laubner** and F.Jakob.2000. Regulation der Hormon abhängigen Proinsulin-Genexpression durch den Transkriptionsfaktor Signal Transducer and Activator of Transcription 5b (STAT5B). *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes*. 108(Suppl.1):S68 (Abstr.) (Poster)
 4. Seufert, J., **K. Laubner** and F.Jakob.2000. Signaling and gene regulation by leptin in pancreatic beta-cells involves suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3). *Proceedings of the 82nd Annual Meeting of the Endocrine Society, Toronto, Canada* (Abstr.) (Vortrag)
 5. Seufert, J., **K. Laubner** and F.Jakob.2000. Signaling and gene regulation by leptin in pancreatic beta-cells involves suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3). *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 108A33-A34 (Abstr.) (Poster)
 6. Seufert, J., **K. Laubner**, S. Royer, J. Roller, T. J. Kieffer, F.Jakob.2001. Proinsulin gene transcription activation by synergistic interactions of STAT5b and the homeodomain protein PDX-1 with the CBP/p300 coactivator in pancreatic beta-cells. *Exp.Clin.Enocrinol.Diabetes*.109(Suppl.1):S46 (Abstr.) (Poster)
 7. Seufert, J., **K. Laubner**, T. J. Kieffer, F.Jakob.2001. Leptin mediated signal transduction in Pancreatic beta-cells. *Exp.Clin.Enocrinol.Diabetes*. 109(Suppl.1):S21 (Abstr.) (Vortrag)
 8. Seufert, J., **K. Laubner** and F.Jakob.2001. Hormonabhängige Signaltransduktion und Genregulation in Insulin produzierenden β -Zellen des endokrinen Pankreas. *Med.Klin.* 96(Abstr.Band):201(Abstr.) (Poster)
 9. Seufert, J., **Laubner, K.**, Royer, S., Roller, J., Kieffer, T. J. and Jakob, F.2001. Proinsulin gene transcription activation by synergistic interactions of STAT5b and the homeodomain protein PDX-1 with the CBP/p300 coactivator in pancreatic beta-cells. *Diabetes und Stoffwechsel* 10(Suppl.1):26 (Abstr.) (Vortrag)
 10. Seufert, J., **Laubner, K.**, Kieffer, T.J., and Jakob, F. 2001 Leptin mediated signal transduction in Pancreatic beta-cells. *Diabetes und Stoffwechsel* 10(Suppl.1):40-41 (Abstr.) (Vortrag)
 11. Seufert, J., **Laubner, K.**, Kieffer, T.J. and Jakob F.2001 Leptin mediated signal transduction in pancreatic beta-cells. *Proceedings of the VIIIth International Symposium on Insulin Receptors and Insulin Action89, Geneva* (Abstr.) (Vortrag)

-
12. Seufert, J., **Laubner, K.**, Royer, S., Roller, J., Kieffer, T.J., and Jakob, F. 2001. Proinsulin gene transcription activation by synergistic interactions of STAT5b and the homeodomain protein PDX-1 with the CBP/p300 coactivator in pancreatic beta-cells. *Proceedings of the 83rd Annual Meeting of the Endocrine Society, Denver, Colorado, USA86* (Abstr) (Poster)
 13. Seufert, J., **Laubner, K.**, Royer, S., Roller, J., Kieffer, T.J., and Jakob, F. 2001. Leptin mediated signal transduction in pancreatic beta-cells. *7th German Pancreatic Islet Workshop, German Diabetes Association* (Abstr.) (Vortrag)
 14. Seufert, J., **Laubner, K.**, Royer, S., Roller, J., Kieffer, T.J., and Jakob, F. 2001. Proinsulin gene transcription activation by synergistic interactions of STAT5b and the homeodomain protein IDX-1 with the CBP/p300 coactivator in pancreatic beta-cells. *7th German Pancreatic Islet Workshop, German Diabetes Association* (Abstr.) (Vortrag)
 15. Seufert, J., **Laubner, K.**, Kieffer, T.J., and Jakob, F. 2001. Leptin mediated signal transduction in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 50(Suppl.2):A341 (Abstr.)
 16. **Laubner, K.**, Kieffer, T.J., Nixdorf, S., Jakob, F., and Seufert, J. 2003. Signaltransduktion und Genregulation durch Leptin in Beta-Zellen des endokrinen Pankreas. *Med.Klin.* 98(Abstract-Band 1):162-162 (Abstr.) (Poster)