

**Fettsucht mit erhöhter D-Glukose-Absorption im  
Dünndarm durch Inaktivierung  
des Regulatorproteins RS1  
bei Mäusen**

Dissertation zur Erlangung  
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius- Maximilians- Universität Würzburg

vorgelegt von

Christina Oßwald,  
geborene Track

aus

Erlangen

Würzburg 2003

Eingereicht am: 28.10.2003

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ulrich Scheer  
Gutachter: Prof. Dr. Hermann Koepsell  
Gutachter: Prof. Dr. Roland Benz

Tag des Promotionskolloquiums: 11.02.2004

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
2.1 Zuckertransporter	5
2.2 Regulation des Zuckertransports	6
2.3 Das RS1- Protein	9
2.4 Transgene Tiere	11
2.5 Aufgabenstellung	13
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Allgemeine Methoden</b>	<b>14</b>
3.1.1 Sterilisation und Desinfektion	14
3.1.2 RNase-freie Ausrüstung	14
3.1.3 Beschichtung von Objektträgern	14
3.1.4 Allgemeine Lösungen	15
3.1.5 Deionisation von Glyoxal	15
<b>3.2 Mikrobiologische Methoden</b>	<b>16</b>
3.2.1 Bakterienmedien	16
3.2.2 Bakterienanzucht	16
3.2.3 Dauerkulturen	16
3.2.4 Herstellung kompetenter <i>E. Coli</i> Zellen für die Elektroporation	16
3.2.5 Transformation elektrokompeter <i>E. Coli</i> Zellen	17
<b>3.3 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>17</b>
3.3.1 Nukleinsäuren	17
3.3.1.1 Plasmide	17
3.3.1.2 Oligonukleotide	18
3.3.1.3 Nukleinsäure-Größenmarker	18
3.3.2 Präparation von Nukleinsäuren	19
3.3.2.1 Präzipitation von Nukleinsäuren	19
3.3.2.2 Phenol/Chloroform-Extraktion	19
3.3.2.3 Plasmidpräparation aus Bakterien durch alkalische Lyse	20
3.3.2.4 Quantitative Isolation von Plasmid- DNA	20
3.3.2.5 Präparation von genomischer DNA	21
3.3.2.6 Isolation von genomischer DNA aus der Schwanzspitze	21
3.3.2.7 Präparation von Gesamt-RNA	22
3.3.2.8 Präparation von poly(A) <sup>+</sup> -RNA	22
3.3.3 Modifikation von Nukleinsäuren	23
3.3.3.1 Restriktion von DNA	23
3.3.3.2 Modifikation von DNA mit dem Klenow-Fragment	24
3.3.3.3 Phosphorylierung von DNA durch die T4 Polynukleotidkinase	24
3.3.3.4 Ligation der DNA	24
3.3.3.5 Radioaktive Markierung von DNA	24

3.3.3.6 Polymerase-Kettenreaktion	25
3.3.3.7 Reverse-Transkriptase-PCR	26
3.3.4 Analyse von Nukleinsäuren	26
3.3.4.1 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA	26
3.3.4.2 Agarosegelelektrophorese von DNA	27
3.3.4.3 DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen	27
3.3.4.4 Agarosegelelektrophorese denaturierter RNA	28
3.3.4.5 Southern-Transfer	28
3.3.4.6 Northern-Transfer	29
3.3.4.7 Southern-Hybridisierungen	30
3.3.4.8 Northern-Hybridisierungen	30
3.3.5 „Run-off“ Transkriptions Assay	32
3.3.5.1 Isolation von Zellkernen für die RNA-Synthese	32
3.3.5.2 RNA Synthese und radioaktive Markierung	32
3.3.5.3 Immobilisierung von c-DNA	33
3.3.5.4 Hybridisierung des cDNA-Dot-Blots	34
3.3.6 Analyse der Transkriptionsrate	34
<b>3.4 Proteinchemische Methoden</b>	<b>35</b>
3.4.1 Erzeugung von polyklonalen Antikörper	35
3.4.1.1 Kopplung des Peptids	35
3.4.1.2 Gewinnung von Antiseren	36
3.4.1.3 Titerbestimmung	37
3.4.1.4 Affinitätsreinigung von Antiseren	38
3.4.1.5 Lagerung affinitätsgereinigter Antiseren	39
3.4.2 Isolation von Gewebs- und Zellfraktionen	39
3.4.2.1 Differenzielle Fraktionierung von Gewebe	39
3.4.2.2 Gewinnung von Bürstensaummembranen	40
3.4.2.3 Differenzielle Fraktionierung von Xenopus laevis Oozyten	40
3.4.2.4 Isolation von Mäuse-Blutserum	41
3.4.2.5 Homogenisierung von Fettgewebe	41
3.4.3 Analyse von Proteinen	42
3.4.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung	42
3.4.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
3.4.3.3. Elektrotransfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamid-Gelen	43
3.4.3.4 Western-Blot-Detektion	44
3.4.4 Immunfluoreszenz	45
3.4.4.1 Einfachmarkierung	45
3.4.4.2 Doppelmarkierung	46
3.4.5 Detektion von Leptin mittels ELISA	47
3.4.6 Detektion von Insulin mittels ELISA	47
<b>3.5 Untersuchungen des Lipidstoffwechsels</b>	<b>48</b>
3.5.1 Untersuchung von Parametern des Lipidstoffwechsel im Blut	48
3.5.2 Analyse der Fettzellgröße	48
3.5.3 Analyse des der Körperzusammensetzung	49
<b>3.6 Kulturtechniken</b>	<b>50</b>
3.6.1 Kultur von LLC-PK <sub>1</sub> -Zellen	50

3.6.2 Anlegen von Kryokulturen von LLC-PK <sub>1</sub> -Zellen	50
3.6.3 Kultur von Fettzellexplantaten	51
<b>3.7 RS1-knock-out Maus</b>	<b>51</b>
3.7.1 Erzeugung und Rückkreuzung der	51
3.7.2 Haltung und Verwendung der Mäuse	52
<b>3.8 Physiologische Untersuchungen der RS1-knock-out Maus</b>	<b>52</b>
3.8.1 Gewichtsanalyse	52
3.8.2 Analyse des Fressverhaltens	53
3.8.3 Aktivitätstest	53
3.8.4 Oraler Glukosebelastungstest	53
3.8.5 Untersuchung der Glukoseabsorption im Darm	54
<b>3.9 Mikroskopie</b>	<b>55</b>
3.9.1 Lichtmikroskopie und Photographie	55
3.9.2 Konfokales Laserscan	55
<b>3.10 Statistische Analyse</b>	<b>56</b>
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>57</b>
<b>4.1 Nachweisverfahren des Knock-out-Ereignisses</b>	<b>57</b>
4.1.1 Genomische Southern-Blot Hybridisierung	57
4.1.2 Genomische PCR	59
4.1.3 Northern-Blot Hybridisierung	60
4.1.4 Western-Blot-Detektion	61
<b>4.2 Verteilung des RS1-Proteins im Dünndarm der Wildtyp-Maus</b>	<b>62</b>
<b>4.3 Untersuchungen zum Phänotyp der RS1-knock-out Mäuse</b>	<b>64</b>
4.3.1 Beschreibung des Phänotyps	64
4.3.2 Gewichtsbestimmung	65
4.3.3 Analyse der Körperzusammensetzung	66
4.3.4 Untersuchung der Fettzellgröße	66
4.3.5 Immunhistologischer Nachweis von mRS1 am Fettgewebe	68
<b>4.4 Physiologische Untersuchungen</b>	<b>69</b>
4.4.1 Analysen des Fressverhaltens	69
4.4.2 Aktivitätstest	71
<b>4.5 Untersuchung von D-Glukose und Lipiden im Blutserum</b>	<b>72</b>
<b>4.6 Regulation der Glukose im Blutserum und Reabsorption der Glukose im Darm</b>	<b>73</b>
4.6.1 Oraler Glukosebelastungstest	73
4.6.2 Glukoseabsorption im Darm	74
<b>4.7 Expression des SGLT1 und GLUT2 am Dünndarm</b>	<b>76</b>
4.7.1 Immunhistologische Verteilung des SGLT1 am Darm	76
4.7.2 Quantifizierung der SGLT1-Proteinexpression am Darm	79
4.7.3 Untersuchung der SGLT1-mRNA-Expression am Darm	80
4.7.4 GLUT2 mRNA-Expression am Darm	82
4.7.4 Quantifizierung der GLUT2-Proteinexpression am Darm	83
<b>4.8 Expression des SGLT1 an der Niere</b>	<b>84</b>
4.8.1 Immunhistologische Verteilung des SGLT1 an der Niere	84

4.8.2 Quantifizierung der SGLT1-Proteinexpression in der Niere	86
4.8.3 Untersuchung der mRNA-Expression verschiedener Transporter an der Niere	87
<b>4.9 Insulin- und Leptinkonzentrationen im Blutserum</b>	<b>88</b>
4.9.1 Detektion von Insulin im Blutserum	88
4.9.2 Detektion von Leptin im Blutserum	89
<b>4.10 Untersuchung der Leptinsekretion an Fettzellexplantaten</b>	<b>90</b>
<b>4.11 Ursache der erhöhten Leptinsekretion</b>	<b>92</b>
4.11.1 Untersuchung der Leptin-mRNA Expression	92
4.11.2 Untersuchung der Proteinexpression des Leptins	93
4.11.3 Beeinflussung der Leptinsekretion durch den Glukose Transporter GLUT4	96
<b>5 DISKUSSION</b>	<b>101</b>
<b>5.1 Lokalisation und Funktion des RS1-Proteins</b>	<b>101</b>
<b>5.2 Untersuchung der RS1-knock-out Maus</b>	<b>102</b>
5.2.1 Phänotyp der RS1-knock-out Maus	103
5.2.2 Auswirkungen auf Darm und Niere	103
5.2.3 Auswirkungen auf das Fettgewebe	105
5.2.4 Entstehung einer Adipositas	106
<b>5.4. Ausblick</b>	<b>110</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>112</b>
<b>7 ANHANG</b>	<b>123</b>
<b>7.1 Transkriptions-Untersuchung an LLC-PK1-Zellen</b>	<b>123</b>
7.1.1 Run-off Transkriptions-Assay	123
7.1.2 Analyse der Transkriptionsrate	125
<b>7.2 Untersuchungen zum Schweine SGLT1</b>	<b>127</b>
7.2.1 Nachweis des pSGLT1 in Endothelzellen des Gehirns	127
7.2.2 Immunhistologischer Nachweis von pSGLT1 am Gehirn	129
<b>7.3 Untersuchungen zum humanen SGLT3</b>	<b>130</b>
7.3.1 Nachweis der hSGLT3-mRNA in verschiedenen Geweben	130
7.3.2 hSGLT3- Proteinexpression in Dünndarm und Skelettmuskel	131
7.3.3 Lokalisation des hSGLT3-Proteins im Muskel	132
7.3.4 Immunhistologischer Nachweis von hSGLT3 am Muskel mit Doppelmarkierung	135
7.3.5 Immunhistologischer Nachweis von hSGLT3 am Duodenum	137
<b>7.3 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>140</b>

# 1 Zusammenfassung

RS1 ist ein 67-68 kD großes, ubiquitär exprimiertes Protein, das sich an der Innenseite der Plasmamembran befindet und in den Zellkern wandern kann. Durch immunohistochemischen Untersuchungen an Dünndarmschnitten der Maus konnte RS1 das erste Mal in dieser Arbeit im Kern und an der Membran von Enterozyten gezeigt werden. RS1 wird von einem intronlosen Single Copy Gen kodiert und ist fähig Ubiquitin über eine Ubiquitin-assoziierte (UBA) Domäne zu binden. Es reduziert die Konzentration einiger Proteine in der Plasmamembran. Durch Expressionsversuche in *Xenopus* Oozyten wurde gezeigt, dass RS1 die Menge des Na<sup>+</sup>-D-Glukosetransporters SGLT1 in der Plasmamembran transkriptionsunabhängig reduziert. Entsprechend seiner dualen Lokalisation beteiligt sich RS1 aber auch an der Transkriptionsregulation im Zellkern. In der vorliegenden Arbeit konnten Informationen über die physiologische Funktion des membranassoziierten Regulatorproteins RS1 gewonnen werden. Nach Erstellung einer RS1-knock-out Maus durch Dr. K.-P. Knobloch und Dr. K. Baumgarten wurde sichergestellt, dass ein erfolgreiches Rekombinationsereignis stattgefunden hatte und RS1 tatsächlich nicht mehr exprimiert wurde. Die RS1-knock-out Mäuse waren postnatal lebensfähig, vermehrten sich gut und entwickelten eine Fettsucht mit 30 % mehr Körpergewicht, 80 % mehr Fett und um 40 % vergrößerten Fettzellen. Bei den transgenen Mäusen war weder die Nahrungsaufnahme gesteigert, noch die motorische Aktivität verringert. In der Bürstensaummembran des Dünndarmepithels konnte bei den RS1-knock-out Mäusen die siebenfache Menge an Protein des Na<sup>+</sup>-abhängigen D-Glukosetransporters SGLT1 detektiert werden, während die Konzentration des passiven Glukosetransporters GLUT2 in der basolateralen Membran nicht verändert war. Die Zunahme der SGLT1-Proteinmenge war posttranskriptional bedingt. Bei der RS1-knock-out Maus wirkt sich der in Oozyten beobachtete Effekt an der Plasmamembran aus, während der an konfluenten LLC-PK<sub>1</sub> Zellen gezeigte Effekt im Zellkern nicht zum Tragen kommt. Die transgenen Tiere resorbierten die doppelte Menge an D-Glukose im Dünndarm. Das spricht dafür, dass bei der RS1-knock-out Maus der „turnover“ des SGLT1 beeinflusst sein muss, da die siebenfache SGLT1-Proteinmenge einem verdoppelten Transport über den SGLT1 gegenübersteht. Die RS1-knock-out Mäuse zeigten normale Insulinspiegel und reguläre oralen Glukosebelastungstests. Bei gefütterten Mäusen waren die Serumleptinspiegel ähnlich wie bei Wildtypmäusen, die typische Reduzierung des Serumleptinspiegel konnte bei den Mäusen ohne RS1 aber nicht beobachtet werden. Untersuchungen an Fettzellexplantaten ergaben, dass die Sekretion von Leptin bei RS1-

knock-out-Explantaten erhöht war, während die Leptinsynthese und die insulinabhängige Regulation der Leptinsekretion nicht verändert waren. Mit der RS1-knock-out Maus wurde ein neues Fettsuchtmodell geschaffen. RS1 spielt eine physiologisch wichtige Rolle bei der Regulation der D-Glukoseaufnahme im Darm. Der visceralen Adipositas liegt wahrscheinlich eine gesteigerte Nahrungsutilisation durch die verbesserte Glukoseaufnahme über den SGLT1 im Darm zugrunde. Die gesteigerte Glukoseabsorption ist ursächlich für den Anstieg der Fettmasse. Die Fettzellen vergrößern sich und sezernieren dann mehr Leptin.

## 1 Summary

RS1 is a 67-68-kDa ubiquitously expressed protein, which is localized below the plasma membrane and within the nucleus. In this work, by immunohistochemistry on small intestine of wildtype mice, RS1 protein could be located to nucleus and plasma membrane of enterocytes the first time. An intronless single copy gene encodes RS1. RS1 is able to bind ubiquitin with an ubiquitin associated (UBA) domain, reduces concentration of some proteins in the plasma membrane. Coexpression experiments with RS1 and SGLT1 demonstrated that RS1 decreased the plasma membrane concentration of SGLT1 in *Xenopus laevis* oocytes. These effects were independent of transcription. In addition, consistent with the dual localization of RS1, transcriptional regulation has been observed in the nucleus. This work tries to elucidate the biological role of the plasma membrane-associated regulatory protein RS1. We generated RS1-knock-out mice (Dr. K.-P. Knobeloch and Dr. K. Baumgarten) and exploited them for experimental approaches. After generating RS1-knock-out mice, we verified correct homologous recombination and lack of expression of RS1 gene product. RS1-knock-out mice are viable, breed well, and are obese. Their body weight is increased by 30 %, body fat by 70 %, and mean fat cell volume by 40 % compared with wildtype animals. However, neither food intake was increased nor the motor activity was reduced in RS1-knock-out mice. In brush-border membranes of small intestine, the amount of protein of the Na<sup>+</sup>-dependent D-glucose transporter SGLT1 was increased sevenfold whereas protein expression of the glucose transporter GLUT2 did not differ. The increased amount of SGLT1 protein was not associated with higher expression of mRNA levels, indicating that regulation occurs on posttranscriptional level. At variance with the transcriptional upregulation of SGLT1 observed in confluent LLC-PK1 cells with reduced RS1 expression, the small intestinal upregulation of SGLT1 in RS1-knock-out mice is an effect at the plasma membrane, observed after expression in oocytes. The capacity of small intestinal D-glucose uptake in RS1-knock-out mice was 2fold increased compared to wildtype. This was due to a 7fold posttranscriptional upregulation of SGLT1 protein. The data suggest that the turnover of SGLT1 is changed. Plasma insulin levels were normal in RS1-knock-out mice. Plasma levels of glucose responded adequately upon oral glucose loading. In fed mice lacking RS1, serum leptin was similar as in wildtype, however, the typical starvation-induced reduction of serum leptin was not observed. In fat tissue explants of RS1-knock-out mice, leptin secretion was increased whereas expression of leptin as well as insulin-dependent regulation of leptin secretion were not changed. The RS1-knock-out mouse represents a novel model of obesity. RS1 plays a physiologically important role

of regulation of D-glucose absorption in small intestine. Enhanced food utilization as a consequence of increased glucose absorption in the small intestine accounts for visceral type of adipositas of RS1-knock-out mice, probably. The increased glucose absorption leads to the rise in fat mass. The fat cells become larger and secret more leptin.

## 2. Einleitung

Lebensprozesse beruhen zu einem wesentlichen Teil auf den strukturellen und funktionellen Eigenschaften von biologischen Membranen. Zellmembranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, in die Membranproteine eingebaut sind. Sie wirken als selektive Barrieren und ermöglichen einen gerichteten Stoff-, Energie-, und Informationsaustausch zur Aufrechterhaltung des intrazellulären Milieus. Für hydrophobe Moleküle wie Benzol und Gase wie Sauerstoff, Stickstoff oder Kohlendioxid ist die Phospholipiddoppelschicht permeabel, für Wasser ist sie nur bedingt durchlässig, für größere polare Moleküle wie Saccharose oder für Ionen ist sie jedoch undurchlässig. Hier werden spezielle Transportmechanismen notwendig, die entweder passiv entlang dem Konzentrationsgefälle oder aktiv und energieverbrauchend gegen den Konzentrationsgradienten ablaufen können.

### 2.1 Zuckertransporter

D-Glukose besitzt eine Schlüsselrolle im Zellstoffwechsel und kann Zellmembranen nur mit Hilfe von Transportproteinen überqueren. Für den Transport von Glukose durch die Plasmamembran werden zwei grundlegende Familien von Glukosetransportern unterschieden. Zum einen die sekundär aktiven  $\text{Na}^+$ -D-Glukosetransporter (Hediger and Rhoads, 1994), deren Mitglieder Glukose intrazellulär zu konzentrieren vermögen und die aktive Aufnahme von Glukose ermöglichen. Von großer Bedeutung ist hier der hochaffine  $\text{Na}^+$ -abhängige D-Glukosetransporter SGLT1. Die sogenannte SGLT-Familie besteht aus Homologen des  $\text{Na}^+$ -D-Glukosetransporters und schließt Sequenzen von Säugern, Eubakterien, Hefen, Insekten und Nematoden ein. Diese Plasmamembrankotransporter befördern Substrate wie Zucker, Inositol, Prolin, Pantothenat, Iodid und Harnstoff. Es gibt mittlerweile über 35 Mitglieder der SGLT-Familie, auf die hier nicht einzeln eingegangen werden kann. Der  $\text{Na}^+$ -D-Glukosetransporter SGLT1 ist ein etwa 70 kDa großes Protein mit 14 Transmembrandomänen und einem hochkonservierten Bereich zwischen der Transmembrandomäne sechs und sieben. Der sekundär aktive Glukosesymporter SGLT1 wird am stärksten in der luminalen Bürstensaummembran der Dünndarmepithelzellen (Takata et al., 1992) und im S3 Segment des proximalen Nierentubulus exprimiert (Hediger and Rhoads, 1994; 1994; Koepsell and Spangenberg, 1994). Auch im

Gehirn verschiedener Spezies konnte der SGLT1 nachgewiesen werden (Pope et al., 1997).

Zum anderen gibt es die passiven GLUT-Transporter (Gould and Holman, 1993), die Glukose in Richtung des Glukosekonzentrationsgradienten transportieren können. Die GLUT-Proteine sind erleichternde Diffusionssysteme für Glukose, die zwölf Transmembrandomänen besitzen. Es gibt mittlerweile über zehn verschiedene GLUT-Transporter. Bei der Resorption im Dünndarm wird D-Glukose zunächst durch den luminalen  $\text{Na}^+$ -D-Glukosekotrporter SGLT1 in die Darmepithelzellen aufgenommen und gelangt dann mit Hilfe des passiven Transporters GLUT2 in das Interstitium und ins Blut (Hediger and Rhoads, 1994). Der basolateral lokalisierte GLUT2 wird in der Leber und in Pankreaszellen sowie im Dünndarmepithel und im proximalen Nierentubulusepithel exprimiert (De Vos et al., 1995). Aufgrund der niedrigen Affinität ist der GLUT2 unter physiologischen Bedingungen nicht gesättigt (Gould and Holman, 1993). In der Leber ist die durch diesen Transporter vermittelte Glukoseaufnahme proportional zu den schwankenden Glukosekonzentrationen im Pfortaderblut. Fett- und Muskelzellen nehmen D-Glukose über den passiven Glukosetrporter GLUT4 auf (Bell et al., 1993).

## 2.2 Regulation des Zuckertransports

Wie viele andere Plasmamembrantransporter unterliegen die Glukosetrporter komplexen Regulationsmechanismen, deren Komponenten nur teilweise bekannt sind. Die Regulation der D-Glukose-Resorption im Dünndarm, der Ausscheidung von D-Glukose in der Niere und der Aufnahme von D-Glukose in Fett- und Muskelzellen ist von großer medizinischer Bedeutung, da die Volkskrankheiten Fettsucht, Diabetes und Koronarsklerose durch Fehlregulationen des Glukosestoffwechsels bedingt sein können beziehungsweise mit diesen einhergehen. Transporter aus beiden Glukosetrporterfamilien werden dabei unterschiedlich reguliert. Die Regulation des Glukosetrportes ist vom Zelltyp abhängig und bedient sich verschiedener molekularer Mechanismen (Hediger and Rhoads, 1994; Klip et al., 1994).

Die Aktivität des intestinalen  $\text{Na}^+$ -abhängigen D-Glukosekotrporter SGLT1 zeigt eine zirkadiane Periodizität. Dieser 24-Stunden-Rhythmus ist transkriptional reguliert (Rhoads et al., 1998). Die stärkste mRNA- und Proteinexpression ist am Ende der Lichtperiode zu finden, während einer Dunkelperiode nehmen mRNA und Transportprotein parallel ab. Damit verbunden ist auch ein An- und Abstieg der Transportaktivität (Tavakkolizadeh et al., 2000). Im Dünndarm wird der SGLT1 aber auch in Abhängigkeit des Kohlenhydratgehaltes in der Nahrung reguliert (Debnam et al., 1998;

Ferraris and Diamond, 1998). Dies konnte besonders deutlich am Schaf gezeigt werden (Shirazi-Beechey et al., 1991). Nach dem Abstillen von Lämmern sinkt die Glukosekonzentration im Darmlumen auf null und parallel auch die Expression des SGLT1. Beim adulten Schaf konnte durch Glukoseinfusion eine Steigerung der SGLT1-Transportaktivität erreicht werden. Dieser Regulationsprozess ist posttranskriptional bedingt (Dyer et al., 1997, Lescale-Matys et al., 1993). Auch die Aktivität des GLUT2 wird durch das Vorhandensein von Hexosen im intestinalen Lumen hoch reguliert (Cheeseman, 1993).

Das Alter eines Organismus hat ebenfalls Auswirkung auf die Expression des SGLT1. Bei Ratten konnte ein postnataler Anstieg der SGLT1-mRNA im Darm beobachtet werden (Kojima et al., 1999). Bei Mäusen zeigte sich mit zunehmendem Alter eine Abnahme der Na<sup>+</sup>-abhängigen D-Glukose-Transportproteine im Darm (Ferraris et al., 1993).

Auch hormonelle Regulationsmechanismen spielen beim SGLT1 eine Rolle. So kann die Rate der intestinalen Hexoseabsorption vermindert werden, indem Cholecystokinin (CCK-8) die Menge des SGLT1-Proteins in der Bürstensaummembran verringert. (Hirsh and Cheeseman, 1998). Andererseits kann die Transportaktivität des SGLT1 in der Bürstensaummembran des Darms sowohl durch adrenerge Innervation (Ishikawa et al., 1997), durch eine Infusion des Peptidhormons Glucagon-like-Peptide2 (GLP-2) (Cheeseman, 1997), als auch durch das Neuropeptid Arginivasotocin (AVT) beziehungsweise Arginivasopressin gesteigert werden (De la Horra et al., 2001). Außerdem wird die intestinale Glukoseabsorption durch Glucagon-37 deutlich angeregt (Stümpel et al., 1997). Die intestinale SGLT1 Aktivität wird durch Insulin translational oder posttranslational kontrolliert. Bei Ratten mit unbehandeltem Diabetes ist die Proteinexpression des SGLT1 gesteigert, gleichzeitig ist aber keine Veränderung der mRNA festzustellen (Kurokawa et al., 1995). Nach einer subkutanen Behandlung mit Insulin sinkt die Proteinmenge des SGLT1 wieder auf das Niveau von gesunden Ratten (Kurokawa et al., 1995). Insulin moduliert die kurzfristige intestinale Glukoseabsorption. Eine Erhöhung der Insulinkonzentration in der Pfortader bewirkt eine akut vermehrte Resorption von D-Glukose im Dünndarm (Stümpel et al., 1996). Dieser stimulierende Effekt des Insulins im Pfortaderblut ist mengenabhängig und bei physiologischen Insulinkonzentrationen nachweisbar (Stümpel et al., 1996). Insulin steigert zudem die Aufnahme von D-Glukose in Fett- und Muskelzellen über die passiven Glukosetransporter (Pessin and Bell, 1992). Muskel- und Fettgewebe gehören zu den insulinsensitiven Geweben, die der Kontrolle des Insulins unterstehen. Die Zellen des Fett- und Muskelgewebes integrieren nach Insulingabe vermehrt Protein des Glukosetransporters GLUT4 in die Plasmamembran. Im basalen Zustand wird GLUT4 fast

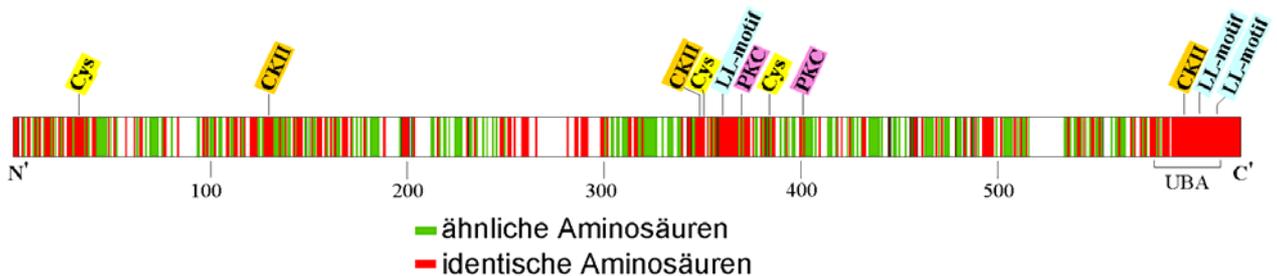
ausschließlich innerhalb der Zelle in den tubulo-vesiculären Elementen, häufig sehr nah an der Zelloberfläche gefunden (Slot et al., 1991). Durch den vermehrten Einbau in die Zelloberfläche wird die Kapazität für den Glukosetransport in diesen Systemen gesteigert (James et al., 1994).

Ferner wurde gezeigt, dass die Proteinkinasen A und C an der Steuerung der SGLT1-Menge in der Plasmamembran beteiligt sind. In diesem Zusammenhang wurde ein Bindungsprotein, welches die Stabilität der SGLT1-mRNA erhöht, identifiziert (Lee et al., 2000; Lofin and Lever, 2001). Maßgeblich beteiligt an der Aktivität des Na<sup>+</sup>-abhängigen Glukosetransporters ist aber auch die Zelldichte (Mullin et al., 1980). In der Zellkultur wird erst nach Ausbildung eines konfluenten Monolayers eine Transportaktivität messbar (Yet et al., 1994). Die konfluenzabhängige Regulation des SGLT1 in LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen ist transkriptional und durch Proteinkinasen vermittelt. Vor Konfluenz ist die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) hoch und der mRNA Level des SGLT1 sehr niedrig (Amsler et al., 1991, Shioda et al., 1994). Nach Konfluenz ist die PKC herunterreguliert, während die Proteinkinase A (PKA) hoch reguliert ist und der Level an SGLT1-mRNA angestiegen ist. Bei Stimulierung der PKC mittels Phorbol-ester ist an differenzierten Zellen eine schnelle Abnahme der SGLT1-mRNA zu beobachten. Die Wirkung der c-AMP abhängigen PKA beruht auf einer verbesserten Stabilität der RNA (Peng and Lever, 1995, Lee et al., 2000).

Die oben beschriebenen Mechanismen können nur einen Einblick in die Vielfältigkeit der Regulation der Glukosetransporter geben. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Funktion des Na<sup>+</sup>-abhängigen D-Glukosetransporters durch Proteinkinase-abhängige Steuerung des Einbaus in die Plasmamembran (Hirsch et al., 1996), durch Änderung der Transkription (Rhoads et al., 1998), teilweise vermittelt durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren (Martin, et al., 2000; Vayro et al., 2001), durch Änderung der Stabilität der mRNA (Peng and Lever 1995, Lee et al., 2000) und durch translationale oder posttranslationale Kontrolle (Kurokawa et al., 1995) reguliert wird. Als physiologische Signale dieser Regulationsprozesse wurden die Faktoren wie Tagesrhythmus (Rhoads et al., 1998; Tavakkolizadeh et al., 2000, Alter Kojima et al., 1999; Ferraris et al., 1993), Zellkonfluenz (Shioda et al., 1994), extrazelluläre D-Glukosekonzentration (Shirazi-Beechey et al., 1991; Ohta et al., 1990) und Insulin-konzentration im Blut identifiziert (Stümpel et al., 1996).

## 2.3 Das RS1- Protein

Das hydrophile 67- 68 kDa große RS1-Protein wurde bei dem Versuch den Na<sup>+</sup>-abhängigen D-Glukosetransporter SGLT1 aus dem Schwein zu charakterisieren entdeckt. Bei einem Immunscreening einer cDNA-Expressionsbank der Schweineiere wurde das intronlose Gen isoliert (Veyhl et al., 1993). Homologe RS1-Proteine konnten bisher aus dem Menschen (hRS1), dem Kaninchen (rbRS1) und der Maus (mRS) kloniert werden (Lambotte et al., 1996; Reinhardt et al., 1999; Baumgarten, 1999). Die RS1-Proteine besitzen je nach Spezies eine Länge von 582 bis 623 Aminosäuren und werden durch ein „Single Copy“ Gen codiert (Lambotte et al., 1996; Reinhardt et al., 1999). Die Homologie zwischen ihnen beträgt durchschnittlich 70 %, wobei sich die konservierten Bereiche über die gesamte Sequenz erstrecken und größtenteils kurze Abschnitte sind (vgl. Abb. 2-1). Ein zu 100%-konservierter Bereich liegt am C-Terminus und umfasst 35 Aminosäuren, von denen die letzten 15 besonders hydrophob sind.



**Abb. 2-1 Homologievergleich der RS1-Proteine aus Schwein, Mensch, Kaninchen und Maus**

Die RS1-Proteine besitzen zwei konservierte Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C und drei für die Caseinkinase 2 (Baumgarten, 1999), zudem sind drei konservierte Di-Leucin Motive vorhanden. Am C-Terminus befindet sich eine UBA Domäne (ubiquitin associated domain), welche eine sehr kompakte Struktur aus drei  $\alpha$ -Helices bildet (Dieckmann et al, 1998) und eine nicht kovalente Interaktion mit Ubiquitin ermöglicht (Kühlkamp, 2001). Das RS- Protein ist in vielen verschiedenen Geweben exprimiert und ist intrazellulär mit der Plasmamembran assoziiert (Valentin et al., 2000). Mit Hilfe eines Fusionsproteins zwischen pRS1 und dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) konnte gezeigt werden, dass RS1 nicht nur an der Plasmamembran, sondern auch im Kern lokalisiert ist (Akimjanova et al., 2003). Versuche mit Fusionsproteinen zwischen GFP und trunkierten pRS1-Proteinen

ergaben, dass ein Sequenzbereich der Aminosäuren 363 und 425 für die Kernlokalisierung erforderlich ist und dass die C-terminale UBA Domäne die Kernlokalisierung verstärkt (Akimjanova et al., 2003).

RS1 reduziert die Konzentration einiger Proteine in der Plasmamembran. Entsprechend seiner Lokalisation im Zellkern beteiligt sich RS1 außerdem an der Transkriptionsregulation. Der Na<sup>+</sup>-D-Glukosetransporter SGLT1 (Lambotte et al., 1996) und der organische Kationentransporter OCT2 wurden als Zielproteine von RS1 identifiziert (Reinhardt et al., 1999).

Koexpressionsversuche von RS1 mit SGLT1 oder mit dem  $\beta$ -adrenergen Rezeptor deuten darauf hin, dass RS1 die Abschnürung von Vesikeln vom Trans-Golgi-Apparat und die Endozytose an der Plasmamembran hemmt. (Veyhl et al., 2003) Dabei besteht offensichtlich Selektivität für eine Gruppe von Plasmamembranproteinen. Zum einen ist in hRS1 exprimierenden Oozyten die Plasmamembranoberfläche insgesamt reduziert (Valentin et al., 2000). Zum anderen ist bei Koexpression von hRS1 mit SGLT1 vom Menschen (hSGLT1) die Maximalgeschwindigkeit des exprimierten Transportes und die Menge von hSGLT1 in der Plasmamembran erniedrigt (Reinhardt et al., 1999). Durch Expressionsversuche in *Xenopus* Oozyten wurde gezeigt, dass RS1 die Menge von SGLT1 in der Plasmamembran reduziert. Die nach cRNA Injektion in Oozyten beobachteten Effekte sind transkriptionsunabhängig, da sie nach Blockade der Transkription mit Aktinomycin D in gleicher Weise zu beobachten sind und auch induziert werden können, wenn dialysiertes Zytosol aus hRS1 exprimierenden Oozyten in hSGLT1 exprimierende Oozyten injiziert wird (Veyhl, unveröffentlichte Daten, 2003). Die durch Isoproterenol induzierte Endozytose des  $\beta$ 2-Adrenorezeptors wird durch RS1 vermindert. Dabei handelt es sich um eine posttranskriptionale dynaminabhängige und durch die Proteinkinase C stimulierte Funktion (Veyhl et al., 2003).

Die Funktion von RS1 im Zellkern wurde durch Messungen an der renalen Epithelzelllinie LLC-PK<sub>1</sub> gezeigt. An LLC-PK<sub>1</sub> Zellen, in denen pRS1 stabil überexprimiert oder endogenes pRS1 durch die stabile Expression von antisense pRS1-cRNA reduziert war, konnten Hinweise gesammelt werden, dass RS1 die Transkription von SGLT1 in konfluenten LLC-PK<sub>1</sub> Zellen hemmt (Korn, 1999). In den RS1 überexprimierenden Zelllinien war die mRNA von SGLT1 und das SGLT1 Protein in der Plasmamembran drastisch erniedrigt (Kühlkamp, 2001), während die SGLT1 mRNA und das SGLT1 Protein in RS1-antisense Zelllinien stark erhöht waren (Korn, 1999). Ob diese Effekte auf Änderungen der Transkription beruhen, soll durch "nuclear run off" Analysen mit isolierten Zellkernen aus "RS1-antisense-Zelle" in dieser Arbeit nachgewiesen wer-

den. Da RS1 in den Zellkern wandert, sind direkten Interaktionen von RS1 oder RS1-Spaltprodukten im Zellkern denkbar.

Physiologisch erscheint eine kombinierte Herunterregulation auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene sinnvoll.

## 2.4 Transgene Tiere

Aufgrund der begrenzten Aussagekraft von Oozytenversuchen und Zellkulturmodellen bemühten sich viele Forschergruppen die Methoden des Gentransfers weiter zu entwickeln, um sie auf lebende, ganze Organismen anwenden zu können. Nach erfolgreichen Versuchen an Objekten wie der Drosophila (Rubin and Spradling, 1982) gelang mit der Erzeugung der ersten transgenen Maus ein Durchbruch auf dem Gebiet der Säugetiere. Durch Einführung eines Wachstumshormons wurde eine transgene Maus erstellt, die deutlich größer war als die nicht transgene Kontrollmäuse (Palmiter et al., 1982). Das Genkonstrukt wurde durch Mikroinjektion in den Vorkern einer befruchteten Eizelle gebracht.

Von großer Bedeutung bei der Erstellung von transgenen Tieren ist heute die Technologie des „Gene Targeting“, die auch bei dieser Arbeit Verwendung fand. Bei dieser Methode werden aus Mäuseembryonen am 3,5 Tag pluripotente embryonale Stammzellen entnommen. Durch Elektroporation werden diese Zellen mit dem Targeting Konstrukt transfiziert, mittels Neomycinresistenz selektioniert und amplifiziert. Die Stammzellen, die das Transgen in ihr Genom integriert haben, werden in eine Blastocyste injiziert, die in den Uterus eines scheinchwangeren Weibchens transferiert wird. Bei erfolgreicher Übertragung erhält man einige Chimären als Nachkommen, die optisch leicht identifiziert werden können. Embryonale Stammzellen und Blastocysten werden von Mäusen verwendet, die sich in ihrer Fellfarbe unterscheiden, so dass die Chimären geschecktes Fell besitzen. Einige Chimären können das Transgen in ihre Keimbahn integriert haben und an die nächste Generation weitergeben. Die heterozygoten Nachkommen geben das Transgen entsprechend den Mendelschen Regeln weiter (vgl. Abb. 2-2).

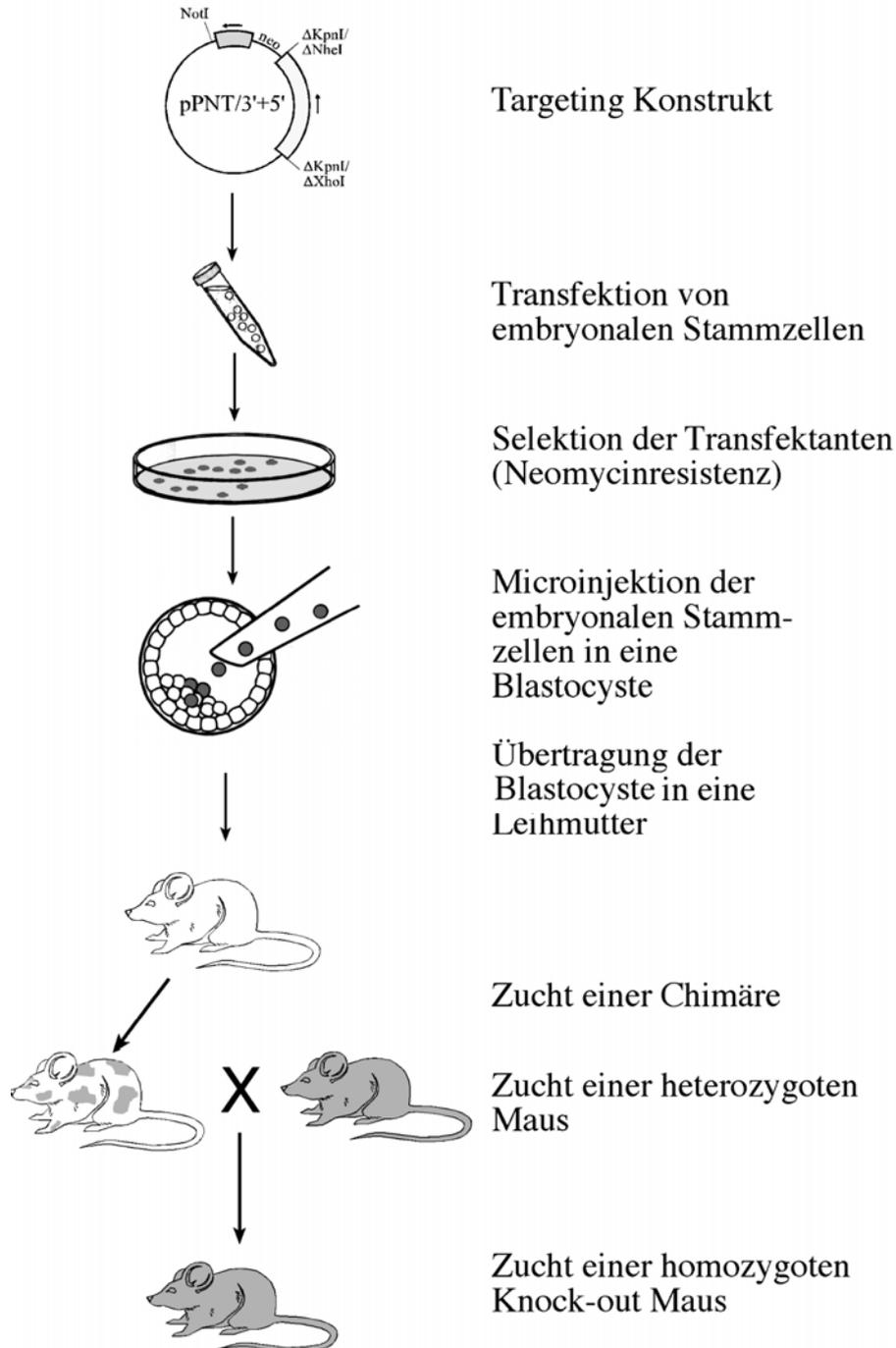


Abb. 2-2 Prinzip der Erstellung von transgenen Mäusen

Die Entwicklung von Methoden zur Erzeugung transgener Tiere ermöglichte die Ermittlung der Funktion bestimmter Gene für einen gesamten Organismus. Zahlreiche Transportsysteme wurden überexprimiert oder ausgeschaltet und die Auswirkung auf den ganzen Organismus untersucht (Charron and Katz, 1998; Wang and Giebisch, 1998, Chen et al., 2001; Jonker et al., 2001).

Mit Hilfe gezielter knock-out Technologien versucht man die Ursachen von Krankheiten zu erforschen oder Stoffwechselwege zu blockieren und auf diese Weise Krankheitsmodelle zu schaffen (Kappel et al., 1994).

## 2.5 Aufgabenstellung

Alle bisherigen Untersuchungen zum RS1-Protein wurden an Zellkulturen und Oozyten erstellt. Die Aussagekraft dieser artifiziellen Systeme ist jedoch begrenzt. Es ist fraglich, ob die beobachteten RS1-Effekte in den Oozyten physiologische Relevanz besitzen, da RS1 im Oozytensystem überexprimiert wurde und daher im Vergleich zu *in vivo* Bedingungen deutlich höhere Proteinkonzentrationen vorlagen. Auch die Zellkulturbedingungen sind nicht direkt auf einen lebenden Organismus zu übertragen. Zusätzlich wurden die Zellen durch antisense Strategie oder durch Überexpression stark verändert und das könnte Einflüsse auf die gesamte Zellmaschinerie haben. Um die physiologische Funktion des RS1-Proteins aufzuklären, wurde eine RS1-knock-out Maus erstellt. Das Targetingkonstrukt zur Erzeugung der RS1-knock-out Maus wurde von Dr. Katharina Baumgarten, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg kloniert. Die Erstellung der RS1-knock-out Maus wurde von Dr. Klaus-Peter Knobeloch, Institut für Molekulare Pharmazie, Berlin übernommen. Zu Beginn der Arbeit war die RS1-knock-out Maus vorhanden, die es zu charakterisieren galt. Einige Nachweisverfahren für die Abwesenheit des RS1-Gens waren bereits vor Beginn dieser Arbeit schon durchgeführt worden. Diese sollten in dieser Arbeit nochmals verifiziert werden. Der Phänotyp der RS1-knock-out Maus sollte beschrieben werden. Besonderes Augenmerk bei den Untersuchungen sollte auf die Auswirkung des fehlenden RS1-Proteins auf den Na<sup>+</sup>-abhängigen Glukosetransporter SGLT1 in Darm und Niere gerichtet werden.

Untersuchungen an LLC-PK1-Zellen sollten in Anschluss an die Doktorarbeit von Thomas Korn (1999) durchgeführt werden. In einer LLC-PK1-Zelllinie, in der RS1 durch stabil transkribierte antisense RS1-mRNA funktionell ausgeschaltet war, konnte mittels Northern Blot Hybridisierungen gezeigt werden, dass bis zu zehnmal mehr SGLT1-mRNA exprimiert wurde. Auch die mRNA Expression von GLUT1 und OCT2 war erhöht. Ob diese Effekte auf Änderungen der Transkription beruhen, sollte durch "nuclear run off" Analysen mit isolierten Zellkernen aus "RS1-antisense-Zellen" in dieser Arbeit nachgewiesen werden.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Allgemeine Methoden**

Alle angegebenen Lösungen wurden mit Chemikalien des Reinheitsgrades "purum analyticum" und mit demineralisiertem Wasser angesetzt. Reaktionen fanden, soweit nicht anders vermerkt, bei Raumtemperatur (RT) statt.

#### **3.1.1 Sterilisation und Desinfektion**

Plastikeinwegreaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden im Autoklaven (Varioklav H+P Labortechnik) sterilisiert (20 min, 3 bar, 120°C). Wenn möglich wurden Lösungen ebenfalls autoklaviert, ansonsten steril filtriert. Glasgegenstände wurden durch zwei-stündiges Backen bei 200°C sterilisiert. Das Kryotom (Jung CM 3000, Leica, Nussloch) wurde nach jedem Gebrauch mit Cryofect (Leica, Nussloch) desinfiziert.

#### **3.1.2 RNase-freie Ausrüstung**

Bei allen Arbeiten mit RNA wurden Einmalhandschuhe getragen, um eine Kontamination durch RNasen zu vermeiden. Eingesetzte Glasgegenstände wurden über Nacht bei 200°C hitzesterilisiert, Eppendorfgefäße silanisiert und autoklaviert, Spitzen autoklaviert. Gelschlitten, -kämme und -kammern wurden über Nacht in 3 %ige (v/v) Wasserstoffperoxidlösung (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) eingelegt. Verwendete Lösungen wurden mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) angesetzt, ausgeschüttelt über Nacht bei 37°C inkubiert und autoklaviert.

#### **3.1.3 Beschichtung von Objektträgern**

Für histologische Gefrierschnitte wurden silanisierte Objektträger verwendet. Die gereinigten Objektträger wurden 20 Sekunden in 2 % (v/v) Aminopropyltrioxysilan (Sigma, Deisenhofen) in Aceton getaucht. Anschließend wurden sie zweimal kurz in Aceton gewaschen und in staubfreier Atmosphäre bei 60°C 30 min getrocknet.

### 3.1.4 Allgemeine Lösungen

<i>50X Denhardt:</i>	1 % (w/v)	BSA
	1 % (w/v)	Ficoll 400
	1 % (w/v)	Polyvinylpyrrolidon
<i>PBS:</i>	137,0 mM	NaCl
	8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2,7 mM	KCl
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , auf pH 7,4 einstellen
<i>20X SSC:</i>	3 M	NaCl
	300 mM	Na <sub>3</sub> Citrat, mit HCl auf pH 7,0 einstellen
<i>20X SSPE:</i>	3,6 M	NaCl
	200 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	20 mM	EDTA, pH 8
		mit NaOH auf pH 7,4 einstellen
<i>TAE-Puffer:</i>	40 mM	Tris
	20 mM	Essigsäure, auf pH 8,0 einstellen
	1 mM	EDTA
<i>TBS</i>	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
<i>TE-Puffer:</i>	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA, pH 8,0
<i>TENS</i>	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	25 mM	EDTA, pH 8,0
	0,5 %	SDS

### 3.1.5 Deionisation von Glyoxal

Glyoxal oxidiert an der Luft, deshalb musste es vor Gebrauch deionisiert werden. Dazu wurde es über eine Säule, die mit dem Ionenaustauscherharz AG 501-X8 (Bio-Rad, München) gepackt war, geschickt, bis der pH-Wert größer als 5 war. In Aliquots wurde das deionisierte Glyoxal bei -20°C eingefroren und möglichst selten geöffnet.

## 3.2 Mikrobiologische Methoden

### 3.2.1 Bakterienmedien

LB: 10 g/l Casein- Hydrolysat, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl

SOB: 10 g/l Casein- Hydrolysat, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl

SOC: 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glukose in SOB

Die Sterilisation der Medien erfolgte durch Autoklavieren (20 min, 120°C). Für Agarplatten wurden dem LB-Medium 15 g/l Agar zugesetzt. Magnesiumsalze, Glukose und Antibiotika wurden dem abgekühlten, autoklavierten Medium durch Sterilfiltration zugesetzt. Transformierte Bakterienstämme mit *p-Bluescript*-Vektor wurden durch Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin selektioniert.

### 3.2.2 Bakterienanzucht

Zur Anzucht einer Vorkultur wurden 3 ml LB-Medium, das eine entsprechende Menge Ampicillin enthielt, mit einem Bakterienstamm angeimpft. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C und 250 rpm auf dem Schüttelinkubator angezogen. Sie wurde dann entweder zum Animpfen einer größeren Bakterienkultur oder zu einer Plasmidschnellpräparation genutzt.

### 3.2.3 Dauerkulturen

Eine 3 ml Bakterienkultur wurde zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen und zur Herstellung einer Bakteriengefrierkultur verwendet. Mit steril filtriertem 50%igem (v/v) Glycerin in LB wurden Aliquots mit einer Endkonzentration von 15 % erstellt und bei -70°C eingefroren. Aliquots dieser Kryokulturen wurden zur Neuanzucht und zur Kolonievereinzelung auf Selektionsagarplatten verwendet.

### 3.2.4 Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen für die Elektroporation

Für die Elektroporation wurden *E.coli* Zellen DH10B (Grant et al., 1990) verwendet. Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 4 x 250 ml SOB-Medium mit je 1 ml einer Vorkultur *E.coli* inokuliert und in Schikanekolben (1 Liter) bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 1,0 wurde die Kultur im Eisbad abgekühlt und zentrifugiert (2000 xg, 10 min, 4°C). In 10%igem Glycerin (v/v) wurde das Pellet resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 10%igem Glycerin (v/v) aufgenommen, so dass sich eine errechnete OD<sub>600</sub> von 200

ergab. In 50 µl aliquotiert, wurden die elektrokompetenten Zellen in flüssigem Stickstoff oder bei -70°C eingefroren.

### **3.2.5 Transformation elektrokompetenter *E.coli* Zellen**

Zur Transformation wurden 20 µl der elektrokompetenten Zellen mit 1 µl einer Plasmid-DNA, die vorher ligiert und entsalzt worden ist, versetzt. Der Elektroporationsansatz wurde in einer Küvette (Gen Puls-Küvette, Bio-Rad, München) 5 msec einem Strompuls von 1,6 kV ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen in einem 1 ml SOC-Medium suspendiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 100 bis 300 µl des Ansatzes auf entsprechenden Selektionsagarplatten ausgebracht und über Nacht bei 37°C angezogen.

## **3.3 Molekularbiologische Methoden**

### **3.3.1 Nukleinsäuren**

#### **3.3.1.1 Plasmide**

Als Vektor für verschiedene Sequenzen wurde *p-Bluescript<sup>®</sup> II SK (+/-) phagemid* (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Dieser enthielt eine vom T3-Promotor (+) und vom T7-Promotor (-) flankierte "Multiple Cloning Site". *pRc/CMV* (Invitrogen, Leek, Niederlande) diente als eukaryotischer Expressionsvektor. Das Plasmid umfasste unter anderem Enhancer-Promotor-Sequenzen der "Immediate Early Genes" des Zytomegalo-Virus, das Polyadenylierungssignal und die Transkriptionsterminations-Sequenzen des bovinen Wachstumshormon-Gens, den SV40-Virus "Origin of Replication" für episomale Replikation und das Neomycin-Resistenz-Gen. Bei allen Transfektionen eukaryotischer Zellen wurde auf diesen Vektor zurückgegriffen.

### 3.3.1.2 Oligonukleotide

Bezeichnung	5' → 3' Sequenz	5' Position
Maus-RS1: (vgl. Baumgarten, 1999)		
mRS15	CCCCACACCCTTCCCATGGTCATGA	2367
mRS16	GGGAATGCAGACCTTGCCCTTCTTG	1689
pPNT: (vgl. Tybulewicz et al., 1991)		
pPNT3	CCACTTGTGTAGCGGCCAAGTGCCAG	93
Maus-GLUT2: (vgl. Asano et al., 1989)		
MGLUT2F	CACC ACGCAAAGCTGCTG	1580
MGLUT2R	GCCTCTGGTTTACTGAAGAG	1843
Maus-GLUT4: (vgl. Kaestner et al., 1989)		
mGLUT4F	AGAGCAGGAGGTGAAACCCAGTA	1626
mGLUT4R	CACAGCCTAGCCACACAC	1874
Maus-Leptin: (vgl. Chehab et al., 1995)		
mLeptinF	GACACCAAACCCCTCATCAAGAC	88
mLeptinR	GCATTCAGGCTAACATCCAAC	2210

### 3.3.1.3 Nukleinsäure-Größenmarker

Für die Agarosegelelektrophorese von DNA und RNA wurden verschiedene Größenmarker verwendet. Für DNA-Gele entweder ein *100 bp DNA Ladder* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) oder ein *1 kb DNA Ladder* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot):

- *100 bp DNA Ladder:*  
Fragmente in bp: 1000; 900; 800; 700; 600; 500; 400; 300; 200; 100; 80.
- *1 kb DNA Ladder:*  
Fragmente in kb: 10; 8; 6; 5; 4; 3; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,5.

Für RNA-Gele ein *RNA Ladder* (GibcoBRL, Karlsruhe), sechs synthetisierte poly A<sup>+</sup>-RNAs folgender Größe enthielt :

Fragmente in kb: 9,49; 7,46; 4,40; 2,37; 1,35; 0,24.

### 3.3.2 Präparation von Nukleinsäuren

#### 3.3.2.1 Präzipitation von Nukleinsäuren

Zur Fällung der Nukleinsäuren wurden je nach Anforderung verschiedene Methoden eingesetzt:

##### Fällung mit Natriumacetat und Ethanol:

Zu einer Nukleinsäure-Lösung wurde 1/10 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,3) und 2,5 Volumen 96%iges Ethanol zugegeben, bei  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $> 1$  h) fiel die DNA bzw. RNA aus. Durch Zugabe von 2,5  $\mu\text{g}$  Polyacrylamid als Präzipitierhilfe konnte auch eine sofortige Zentrifugation ermöglicht werden.

##### Fällung mit Isopropanol:

Nach Zugabe von 0,8 Volumen Isopropanol präzipitierte die DNA sofort.

##### Fällung mit Lithiumchlorid und Ethanol:

Mit 0,5 M Lithiumchlorid und 2,5 Volumen eiskaltem 96%igem Ethanol war es möglich RNA nach mindestens 1 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zu präzipitieren.

In allen Fällen wurde nach der Präzipitation 30 min bei 14000 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol überschichtet. Die DNA wurde erneut zentrifugiert (10 min, 14000 xg), der Überstand verworfen und die Nukleinsäure luftgetrocknet. Zur Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurde die DNA in einem angemessenen Volumen Puffer bzw. Wasser gelöst. RNA wurde in Wasser gelöst und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Bei der Präzipitation von RNA waren alle verwendeten Lösungen mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt, die Zentrifugationsschritte wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  durchgeführt.

#### 3.3.2.2 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen und Salzen aus DNA-Lösungen wurde häufig eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die DNA-Lösung wurde mit gleichem Volumen einer Chloroform-Phenol-Lösung (1:1 v/v) ausgeschüttelt und 7 min bei 9000 xg zentrifugiert, wobei sich die DNA in der oberen wässrigen Phase anreicherte. Die wässrige Phase wurde wiederum mit dem gleichen Volumen Chloroform-Isoamylalkohol (49:1 v/v) ausgeschüttelt und erneut zentrifugiert.

### 3.3.2.3 Plasmidpräparation aus Bakterien durch alkalische Lyse

(Birnboim und Doly, 1979)

Transformierte *E. Coli*-Zellen wurden in 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikumzusatz bei 37°C im Schüttelinkubator (250 rpm) angezogen. 2 ml der Bakterienkultur wurden in einer Eppendorfzentrifuge 3 min mit 6000 xg bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet in 300 µl P1- Lösung resuspendiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden 300 µl P2-Lösung zur alkalischen Lyse dazugegeben und vorsichtig gemischt. Zur Fällung von hochmolekularer DNA, bakteriellen Proteinen und SDS wurden 300 µl P3-Lösung hinzu pipettiert. Danach wurde 15 min auf Eis präzipitiert. Der Ansatz wurde im Anschluss 15 min bei 20000 xg und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit 0,8 Volumen Isopropanol versetzt. Die Plasmid-DNA wurde nach 10 min bei RT sedimentiert (15000 xg, 10 min, RT), mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser resuspendiert.

P1: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0; 100 µg/ml RNase A frisch zugesetzt

P2: 0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS

P3: 3 M Kaliumacetat, pH 5,3

### 3.3.2.4 Quantitative Isolation von Plasmid-DNA

(nach Quiagen Midi-Protokoll)

Für die Plasmid-Isolation in größerem Maßstab wurden 250 ml LB-Medium, versetzt mit Ampicillin, mit 1 ml einer Vorkultur angeimpft und 12-16 h bei 37 °C im Schüttelinkubator (250 rpm) angezogen. Die Bakterienzellen wurden mittels einer 15minütigen Zentrifugation bei 6000 xg und 4° C geerntet. Der Überstand wurde vollständig abgezogen, das verbleibende Pellet wurde in 10 ml P1-Lösung resuspendiert. Zur alkalischen Lyse wurden 10 ml P2-Lösung dazugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 5 min Inkubation wurden 10 ml kalter Puffer 3 hinzugefügt, leicht umgeschwenkt und 15-20 min auf Eis gestellt. Danach wurde 30 min bei 20000 xg (4°C) zentrifugiert und der klare Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, abgenommen. Der Überstand wurde nochmals zentrifugiert (15 min, 20000 xg, 4°C) und auf eine „Quiagen-tip 500 Säule“ aufgetragen. Diese Säule wurde vorher mit 10 ml QBT-Puffer (im Quiagen-Kit enthalten) äquilibriert. Nach Auftragen des Überstands wurde die Säule zweimal mit 30 ml QC-Puffer (im Quiagen-Kit enthalten) gespült. Die Plasmid-DNA wurde mit 15 ml QF-Puffer (im Quiagen-Kit enthalten) in ein Glas-Corex-Röhrchen eluiert und mit 0,8 Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur präzipitiert. Das nach der Zentrifugation (30 min, 15000 xg, 4°C) entstandene DNA-Pellet

wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, nochmals zentrifugiert (10 min, 15000 xg, 4°C), luftgetrocknet und in 500 µl TE-Puffer aufgenommen.

P1: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0; 100 µg/ml RNase A frisch zugesetzt

P2: 0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS

P3: 3 M Kaliumacetat, pH 5,3

### **3.3.2.5 Präparation von genomischer DNA**

(Gross-Bellard et al, 1973)

Zur Isolierung genomischer DNA wurde tierisches Gewebe unter flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 1 ml TENS (siehe 3.1.4) pro 100 mg Gewebe versetzt. Proteinase K (GibcoBRL, Karlsruhe) wurde in der einer Konzentration von 0,1 mg/ml jeweils frisch zugesetzt. Der Verdau erfolgte über Nacht in Anwesenheit von 0,5 % SDS bei 50°C im Schüttelwasserbad. Durch Zugabe des gleichen Volumens Phenol/Chloroform-Lösung (1:1 v/v) wurde die hochmolekulare DNA extrahiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 1700 xg wurde die wässrige, viskose, obere Phase abgenommen und damit der Vorgang zweimal wiederholt. Abschließend wurde mit 1 Volumen Chloroform/ Isoamylalkohol (49:1 v/v) extrahiert. Die DNA wurde in einen Dialyseschlauch, der 10 min in einer kochenden 1 mM EDTA-Lösung (pH 8,0) vorbehandelt worden ist, übertragen. Zur Entsalzung wurde die DNA-Lösung bei 4°C 36 h gegen jeweils 100 Volumina TE-Puffer, pH 8,0, bei dreimaligem Wechsel des Puffers, dialysiert. Die entsalzte DNA wurde bei 4°C gelagert.

### **3.3.2.6 Isolation von genomischer DNA aus der Schwanzspitze**

Zur Analyse der Genotypen nachgezüchteter Mäuse wurde eine PCR genomischer DNA durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die DNA aus den Schwanzspitzen der Mäuse isoliert. Die Schwanzspitzen wurden in einer Länge von 0,5 bis 1 cm abgeschnitten und jeweils in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Zur Isolation der genomischen DNA wurde mit 375 µl TENS (siehe 3.1.4) und 25 µl Proteinase K-TENS-Lösung versetzt und über Nacht bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Die verdauten Proben wurden am nächsten Tag kurz gevortext und dann 7 min bei 10000 xg zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die DNA befand, wurde abgenommen und mit 40 µl 3M Natriumacetatlösung, pH 5,3 und 1 ml 96%igem Ethanol versehen. Nach 20minütiger Präzipitation bei -20°C wurde 10 min mit 14000 xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol überschichtet. Die DNA wurde erneut zentrifugiert (10 min, 14000 xg), der Überstand verworfen und die DNA zum Trocknen an die Luft gestellt. Die DNA wurde in 200 µl dest. Wasser aufgenommen und konnte bei 4°C gelagert werden.

Proteinase K-TENS-Lösung:

10 mg Proteinase K (GibcoBRL, Karlsruhe), 1 ml TENS (3.1.4), Lagerung bei -20°C

### 3.3.2.7 Präparation von Gesamt-RNA

(Chomczynski und Sacchi, 1987)

Zur Isolierung von RNA aus tierischem Gewebe wurde das schockgefrorene Gewebe in flüssigem Stickstoff in einem vorgekühlten Mörser pulverisiert. Das Gewebepulver wurde in einem sterilen 13-ml-Polypropylen Röhrchen in 10 ml/g Denaturierungslösung gegeben. Zur Isolation von RNA aus Zellen wurde von konfluenten LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen einer 14,5-cm-Schale das Kulturmediums abgezogen und 1 ml Denaturierungslösung pro 10<sup>7</sup> Zellen hinzugegeben. Mittels Auf- und Abpipettieren wurde das Lysat homogenisiert und in ein steriles Polypropylen Röhrchen überführt.

Sowohl bei Zell- als auch bei Gewebehomogenisaten wurden danach 1/10 Volumen 2M Na-Acetat, (pH 4,0), 1 Volumen wassergesättigtes Phenol und 4/10 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (49:1 (v/v)) zugegeben, wobei jedes Mal durch Inversion gründlich gemischt wurde. Nach 15 min bei 4°C erfolgte zur Phasentrennung eine Zentrifugation für 20 min bei 10000 xg und 4°C. Die wässrige Oberphase mit der RNA wurde in ein steriles Corex-Röhrchen übertragen und mit 1 Volumen Isopropanol 30 min bei -20°C präzipitiert. In anschließender 10-minütiger Zentrifugation bei 10000 xg und 4°C wurde die RNA pelletiert. Das Pellet wurde nach Abzug des Überstands in 3/10 Volumen Denaturierungslösung aufgenommen, in ein silanisiertes 2 ml Eppendorf-Gefäß übertragen, mit 1 Volumen Isopropanol erneut präzipitiert und zentrifugiert. Nach Waschen in 75 % Ethanol in H<sub>2</sub>O<sub>depc</sub> und erneuter Zentrifugation wurde das RNA-Pellet luftgetrocknet, in H<sub>2</sub>O<sub>depc</sub> aufgenommen und bei -70°C gelagert.

Denaturierungslösung:

4 M Guanidiniumthiocyanat; 25 mM Na<sub>3</sub>Citrat, pH 7; 0,1 M β-Mercaptoethanol; 0,5 % (w/v) N-Lauroylsarcosin.

### 3.3.2.8 Präparation von poly(A)<sup>+</sup>-RNA

Da die mRNA eukaryotischer Zellen, mit Ausnahme von Histon-mRNA, einen poly(A)<sup>+</sup>-Rest von 150 bis 200 Adenylatresten an ihrem 3'-Ende trägt, konnte dies zu einer säulenchromatographischen Reinigung ausgenutzt werden. Zur Isolation der poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus Gesamt-RNA wurde ein „Oligotex mRNA Spin-Column Kit“ (Quiagen, Midikit, #70042) verwendet, wobei die mRNA über eine oligo-dT-Affinitätsmatrix angereichert wurde.

Zur Präparation wurden 0,25 bis 1,00 mg total-RNA (spektralphotometrisch ermittelt: 3.3.4.1) in 500 µl RNase freiem Wasser gelöst und 1 Volumen OBB-Puffer (im Kit enthalten) versetzt. Je nach eingesetzter RNA-Menge wurden 30-55 µl der auf 37°C erwärmte Oligotex-Suspension (im Kit enthalten) hinzu gegeben. Um die Sekundärstruktur der RNA zu zerstören, wurde die Probe 3 min auf 70°C erhitzt. Zur Hybridisierung der Oligo-dT-Matrix mit den poly(A)<sup>+</sup>-Schwänzen wurde die Probe 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend 2 min bei 14000 xg zentrifugiert. Das mRNA-Pellet wurde in 400 µl OW2-Puffer (im Kit enthalten) resuspendiert und auf eine im Kit enthaltene Säule übertragen. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 14000 xg wurde die Säule in ein neues Eppendorf-Gefäß übertragen, das Pellet in 400 µl OW2-Puffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Die Säule wurde erneut in ein weiteres Eppendorf-Gefäß übertragen, das Pellet wurde zweimal in 100 µl 70°C warmem OEB-Puffer (im Kit enthalten) resuspendiert und jeweils 1 min bei 14000 xg zentrifugiert. Die eluierte mRNA wurde 2 h bei -20°C präzipitiert, indem eine 0,3 M Natriumacetat-Konzentration eingestellt und 2,5 Volumen Ethanol zugegeben wurden. Nach Pelletierung der mRNA (30 min, 14000 xg, 4°C) wurde der Überstand vorsichtig abgezogen und das Pellet nach einem Waschgang in 75 %igem Ethanol in H<sub>2</sub>O<sub>depc</sub> luftgetrocknet. Die poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurde in H<sub>2</sub>O<sub>depc</sub> aufgenommen. Zur spektralphotometrischen Mengenbestimmung (3.3.4.1) wurde ein Aliquot aus der poly(A)<sup>+</sup>-RNA-Lösung entnommen. Lagerung erfolgte bei -70°C.

### **3.3.3 Modifikation von Nukleinsäuren**

#### **3.3.3.1 Restriktion von DNA**

Restriktionsendonukleasen vom Typ II sind bakterielle Enzyme, die spezifische, meist palindrome DNA-Sequenzen erkennen. Sie schneiden die DNA durch Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung in jedem Strang.

Die Restriktion von DNA erfolgte unter den vom Hersteller angegebenen Puffer- und Temperaturbedingungen. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0, oder durch 10minütige Inkubation bei 70°C gestoppt. Die DNA wurde einer Phenol/Chloroform-Extraktion (3.3.2.2) unterzogen und mit Ethanol präzipitiert (3.3.2.1).

### 3.3.3.2 Modifikation von DNA mit dem Klenow-Fragment

Mittels der Polymeraseaktivität des Klenow-Fragments<sup>1</sup> konnten im 3'-Bereich zurückgesetzte DNA-Enden aufgefüllt werden. Die Reaktion wurde in Gegenwart von 0,3 U/μl Klenow-Fragment (GibcoBRL, Karlsruhe) und 60 μM dNTPs in einem Volumen von 30 μl und einem Puffer aus 50 mM Tris/HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT und 50 μg/ml BSA durchgeführt. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch eine 10minütige Behandlung bei 70°C gestoppt.

### 3.3.3.3 Phosphorylierung von DNA durch die T4 Polynukleotidkinase

PCR-Fragmente, die an ihrem 5'-Ende keine Phosphorylierung aufwiesen, mussten vor der Klonierung mit der T4-Polynukleotidkinase (Stratagene, Heidelberg) phosphoryliert werden. Die Reaktion erfolgte bei 37°C (30 min) mit einer Endkonzentration von 0,1 mM dATP und 10 U Enzym in einem Endvolumen von 30-50 μl.

### 3.3.3.4 Ligation der DNA

(Dower et al., 1988)

Zur Ligation von DNA-Fragmenten konnten mit der T4-DNA-Ligase (4 U/μl) (Stratagene, Heidelberg) 3'-Hydroxylgruppen mit 5'-Phosphatgruppen unter Bildung von Phosphodiesterbrücken miteinander verknüpft werden. Fragment und Vektor wurden in einem molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt, wobei die Vektormenge 20-50 ng betrug. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 20 μl in 1x Ligase Puffer für 16 h bei 14°C. Im Reaktionsgemisch waren 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM rATP und 66 mM Tris/HCl (pH 7,5) enthalten.

Für eine anschließende Elektroporation wurde der Ligationsansatz mit Hilfe einer Phenol-Chloroform-Extraktion entsalzt und mit Natriumacetat, Ethanol und Polyacrylamid präzipitiert (3.3.2.2). Die luftgetrocknete DNA wurde in 5 μl Wasser aufgenommen. 1 μl dieser DNA-Lösung wurde für die Elektroporation eingesetzt.

### 3.3.3.5 Radioaktive Markierung von DNA

Für die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP (3000 Ci/mmol, ICN, Eschwege) zum Einsatz als Sonde wurde das „RadPrime-DNA-Labeling System„ (GibcoBRL, Karlsruhe) verwendet, wobei für einen Polymerisationsansatz 50 μCi eingesetzt wurden. 200-500 ng DNA wurden für 5 min bei 100°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Das Reaktionsgemisch wurde nach Anweisung des Herstellers erstellt.

Nicht markiertes dCTP, dGTP, dTTP und radioaktiv markiertes  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP lagerte sich an die einzelsträngige DNA als Matrize an. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA (Stopp-Puffer, im Kit enthalten) gestoppt. Vor der Gabe zur Hybridisierungslösung wurde die Probe erneut 5 min bei 100°C denaturiert und auf Eis abgekühlt.

### 3.3.3.6 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich spezifische DNA-Fragmente *in vitro* amplifizieren. Dabei werden wiederholte Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation durchgeführt. Bei der Denaturierung (94°C) wird die als Matrize eingesetzte DNA denaturiert. Bei dem darauf folgenden Annealing kommt es zu einer spezifischen Oligonukleotid-Hybridisierung (40-60°C je nach Primern) und bei der Elongation findet eine DNA-Synthese ausgehend vom Oligonukleotid (72°C) statt. Als Enzym für die DNA-Synthese wurde die hitzeunempfindliche Taq-Polymerase (Boehringer, Mannheim oder Gene Craft, Münster) des Eubakteriums *Thermus aquaticus* eingesetzt. Das Reaktionsgemisch enthielt in einem Volumen von 50 µl in einfacher Konzentration den vom Hersteller mitgelieferten PCR-Puffer mit MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM  $\Sigma$ NTPs und je 25 pmol Primer. Zur Amplifikation wurden 1 µg genomische DNA oder 1-10 ng Plasmid DNA eingesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde mit zwei Tropfen Paraffinöl überschichtet. In der Regel wurden 35 Reaktionszyklen durchgeführt (PCR Thermal Cycler, MWG, Biotech, England).

10x PCR-Puffer: 100 mM Tris-HCl; 0,5 M KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,3

Zur Genotypanalyse der nachgezüchteten Mäuse wurde eine standardisierte PCR verwendet. Je Ansatz wurden 8 µl  $\Sigma$ NTPs ( $\Sigma$  1,25 mM), 5 µl 1x PCR-Puffer (vom Hersteller mitgeliefert), 2 µl der RS15-Primer Lösung (25pmol/µl) (3.3.1.2), 1 µl der RS16-Primer Lösung (25pmol/µl) (3.3.1.2), 1 µl der pPNT3-Primer Lösung (25pmol/µl) (3.3.1.2), 1 µl Taq-Polymerase (Gene Craft, Münster), 5 µl DNA-Lösung (3.3.2.6) und 27 µl dest. Wasser in ein PCR-Gefäß pipettiert und mit zwei Tropfen Paraffinöl überschichtet. Nun konnte eine PCR mit folgendem Programm gestartet werden (PCR Thermal Cycler, MWG, Biotech, England):

---

<sup>1</sup> Das Klenow-Fragment ist das große Fragment der DNA-Polymerase I von *E.coli* und besitzt neben seiner DNA-Polymerase- auch noch 3'→5'-Exonuclease-Aktivität.

90 °C	5 min	1x	Denaturierung
94 °C	30 sec	35 x	Denaturierung
60 °C	1 min		Annealing
72 °C	1.20 min		Elongation
72 °C	5 min	1x	

### 3.3.3.7 Reverse-Transkriptase-PCR

(Kawasaki et al., 1988)

Zur Klonierung von DNA-Sequenzen wurde isolierte Gesamt-RNA oder mRNA mittels reverser Transkription in cDNA umgesetzt. Es wurde das „SuperScript™ One-Step™ RT-PCR System“ (GibcoBRL, Karlsruhe) benutzt, bei dem in demselben Reaktionsgemisch zunächst die reverse Transkription und die anschließende PCR erfolgten. Zur Durchführung dieses Prozesses wurden 5 µg Gesamt-RNA oder 0,1 µg mRNA eingesetzt. Die reverse Transkription erfolgte für 30 min bei 50°C, danach schloss sich ein PCR-Programm nach Angaben des Herstellers an. Für den Reaktionsansatz wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl 25 pmol des Primers, 0,16 U/µl Ribonuclease Inhibitor (MBI Fermentas, St. Leon-Rot), 25 µl Reaktions-Mix, der  $\Sigma$ NTPs und Magnesiumsulfat enthielt, und 1µl Enzym-Mix eingesetzt. (Reaktions- und Enzym-Mix wurden vom Hersteller geliefert).

### 3.3.4 Analyse von Nukleinsäuren

#### 3.3.4.1 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren konnten spektralphotometrisch ermittelt werden. Mit Hilfe einer Wolfram-Lampe wurde die Extinktion bei 260 nm und bei 280 nm bestimmt. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht bei DNA 50 µg/ml und bei RNA 40 µg/ml. Der Grad der Reinheit wurde aus dem Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  errechnet. 2,0 für RNA und 1,8 für DNA entsprachen sauber isolierten Nukleinsäuren, während Kontaminationen mit Proteinen oder Phenol zu niedrigeren Werten führten.

### 3.3.4.2 Agarosegelelektrophorese von DNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1%ige (w/v) TAE-Agarosegele verwendet. Zu Herstellung wurden 50 ml TAE-Puffer (3.1.4) und 0,5 g Agarose (Applichem, Darmstadt) in einem Erlenmeyerkolben erhitzt, in einen Gelschlitten gegossen und zur Ausbildung von Probetaschen mit einem Kamm versetzt. Um die DNA unter dem UV-Licht sichtbar zu machen, wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zur Gellösung zugegeben. Die DNA-Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 3-8 V/cm in 1x TAE-Puffer. Länge und Menge der DNA wurden auf dem UV-Transilluminator (Herolab, St. Leon) in Bezug auf 500 ng eines 1 kb bzw. 0,1 kb Molekulargewichtsstandard (3.2.1.3) bestimmt.

5X Probenpuffer:

20 % (v/v) Glycerol; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau in TAE-Puffer.

### 3.3.4.3 DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen

Unter UV-Licht (UV-Transilluminator, Herolab, St. Leon) wurde die gewünschte DNA-Bande möglichst knapp aus dem TAE-Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Mit Hilfe des „DNA Purifications Kit Easy Pure“ (Biozym, Hess. Oldendorf) wurde die DNA aus dem Gelblock extrahiert. Zu dem TAE-Gel (3.3.4.2) wurde das dreifache Volumen SALT (im Kit enthalten) gegeben und 5 min auf 55°C unter gelegentlichem Mischen erhitzt. Danach wurden 5 µl + 1 µl je µg erwarteter DNA-Ausbeute BIND (im Kit enthalten) hinzugegeben und 5 min unter häufigem Mischen bei Raumtemperatur inkubiert. Nach kurzem Anzentrifugieren wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in 1 ml WASH-Lösung (im Kit enthalten) vorsichtig resuspendiert und erneut kurz anzentrifugiert. Das Pellet wurde vollständig luftgetrocknet und anschließend in 20 µl dest. H<sub>2</sub>O gelöst. Eine Lagerung war für kurze Zeit bei 4°C, längerfristig bei -20°C möglich.

### 3.3.4.4 Agarosegelelektrophorese denaturierter RNA

(Gründemann und Koepsell, 1994)

Um die Sekundärstruktur der RNA zu zerstören, wurden 1 µl der RNA-Probe 3 µl Glyoxal in DMSO als Denaturierungslösung (bei cRNA-Proben mit Ethidiumbromid) zugesetzt und 1 h bei 55°C inkubiert. Zur Abschätzung der Menge und der Größe der RNA wurden gleichzeitig 2 µl eines RNA-Markers (3.2.1.3), versetzt mit 6 µl Glyoxal/DMSO/ Ethidiumbromid- Denaturierungslösung 1 h bei 55°C erhitzt. Nach Zugabe von je 5 µl Probenpuffer (0,01 % (w/v) Bromphenolblau) wurden die RNA-Proben und der Marker auf ein 1%iges N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-amino-ethansulfonsäure (BES) gepuffertes Agarosegel aufgetragen. Dem Gel wurde zur RNase-Inhibierung 1mg/ml Iodacetat zugesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung fand bei 6 V/cm, unter Umwälzung des Puffers von der Anode zur Kathode, statt.

Da die Denaturierungslösung für Marker und cRNA-Proben Ethidiumbromid enthielt, konnten diese nach der Elektrophorese direkt unter dem UV-Transilluminator (Herolab, St. Leon) betrachtet und fotografiert werden.

Für Northern-Transfer wurde nur dem Marker Ethidiumbromid zugefügt, da Ethidiumbromid den Transfer der zu hybridisierenden Transkripte verschlechtert. Beim anschließenden Fotografieren des Gels musste gleichzeitig ein Zentimetermaßstab abgelichtet werden, um die sichtbaren Banden des Markers mit der Höhe der späteren Northern-Blot-Signale in Relation setzen zu können.

50X BES-Laufpuffer:

0,5 M BES; 5 mM EDTA; pH 6,7 DEPC behandelt

Denaturierungslösung:

71,4 % (v/v) DMSO; 1,43 M Glyoxal (deionisiert); in 1X BES-Laufpuffer

gegebenenfalls Zusatz von 66,6 µg/ ml Ethidiumbromid unmittelbar vor Gebrauch

### 3.3.4.5 Southern-Transfer

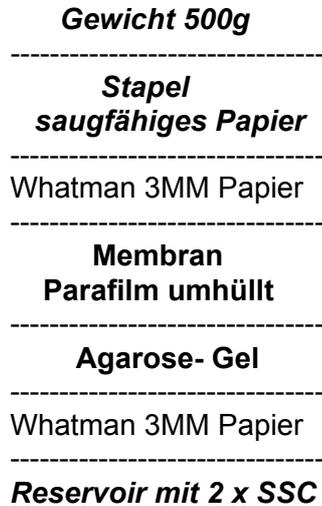
(Reed und Mann, 1985)

Mit der Methode des Kapillarblottings wurde beim Southern-Transfer im Agarosegel getrennte DNA auf eine Nylonmembran (Hybond N™, Amersham, Braunschweig) übertragen.

Nach der Elektrophorese wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator (Herolab, St. Leon) fotografiert und 2 x 15 min in Denaturierungslösung und 2 x 30 min in Neutralisierungslösung auf dem Taumelschüttler bei RT inkubiert. Bei Untersuchungen genomischer DNA wurde vor der Denaturierung eine 15minütige Depurinie-

rung mit 0,25 N HCl durchgeführt. Die Überführung der DNA aus dem Gel auf die Membran erfolgte durch den aufsteigenden 2 x SSC Puffer.

Anordnung des Blots:



Ein Reservoir an Transferlösung (2 x SSC) war über ein Whatman-3MM-Papier als Fließverbindung mit dem Gel verbunden. Zur Vermeidung eines Kurzschlusses wurde die Membran am Rand von einem Parafilm umgeben. Die Kapillarwirkung wurde durch Auflegen eines Stapels saugfähigen Papiers und eines Gewichts (500g) erreicht. Der Transfer erfolgte über Nacht bei RT. Nach dem Transfer wurden auf der Membran die Auftragungstaschen des Gels markiert. Die Membran wurde kurz in 2 x SSC gewaschen und luftgetrocknet. Eine Bestrahlung mit UV-Licht (Stratalinker, Stratagene, Lajolla, USA) führte zur kovalenten Bindung der DNA an die Membran. Bis zur weiteren Hybridisierung konnte die Membran bei RT aufbewahrt werden.

Denaturierungslösung:

1,5 N NaCl, 0,5 N NaOH

Neutralisierungslösung:

1,5 N NaCl, 1M Tris-HCl, pH 7,5

### 3.3.4.6 Northern-Transfer

Beim Northern-Transfer wurde mRNA auf eine Nylonmembran (Hybond N™, Amersham, Braunschweig) übertragen.

Nach der Elektrophorese wurde das RNA-Glyoxal-Gel auf dem UV-Transilluminator (Herolab, St. Leon) mit Lineal fotografiert und 45 min auf einem Taumelschüttler in 10 x SSC gewaschen. Der Aufbau des Kapillarblottings erfolgte wie unter 3.3.4.5 für den Southern-Transfer beschrieben. Nach dem 16-stündigen Transfer wurde die Memb-

ran ebenfalls markiert, kurz in 2 x SSC gewaschen, luftgetrocknet und UV behandelt. Zur Fixierung der RNA wurde die Membran zusätzlich 1,5 h bei 80°C gebacken.

### 3.3.4.7 Southern-Hybridisierung

Der Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen erfolgte durch Hybridisierung membran-gebundener Nukleinsäuren (3.3.4.5) mit radioaktiv markierten Sonden (Hybridisierungssofen, Bachhofer, Reutlingen). Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran einer vierstündigen Prähybridisierung bei 65°C mit Hybridisierungslösung ohne Zusatz der radioaktiven Proben unterzogen. Anschließend wurde für 16 h die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Fragment-Sonde ebenfalls bei 65°C durchgeführt. Nachfolgende Posthybridisierungswaschungen erfolgten mit zunehmender Stringenz:

- |                                |        |       |
|--------------------------------|--------|-------|
| 1. 2 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS    | 40 min | 65 °C |
| 2. 2 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS    | 40 min | 65 °C |
| 3. 0,25 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS | 15 min | 65 °C |

Bei starker Strahlung des Northern-Blots wurde ein vierter Waschschrift für 15 min mit einer Lösung aus 0,1 x SSC; 0,1 % (w/v) SDS bei 65 °C angehängt. In Saranfolie eingeschlagen wurde die Blot-Membran einem Röntgenfilm (RX Nif, Fuji Films) bei -70°C in einer Kassette mit Verstärkerfolien exponiert.

Hybridisierungslösung:

6X SSC; 5X Denhardt; 0,5 % (w/v) SDS;

20 µg/ml denaturierte Heringssperma DNA ( frisch zugesetzt)

50X Denhardt:

1 % (w/v) BSA, 1 % (w/v) Ficoll, 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon

Lösung wurde vor Gebrauch steril filtriert

### 3.3.4.8 Northern-Hybridisierung

Die Hybridisierung der Northern-Membranen erfolgte prinzipiell genauso wie die Southern-Hybridisierung. Die Nylonmembran wurde, mit der RNA-Seite nach innen zusammengerollt und in ein 15ml-Greiner-Röhrchen gegeben. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde 4 h bei 42°C mit 4 ml Prähybridisierungslösung inkubiert. Anschließend wurde die radioaktive DNA-Sonde zugegeben und bei 42°C über Nacht hybridisiert. Die Stringenzbedingungen der nachfolgenden Waschschriffe wurden sukzessive erhöht:

- |                           |        |       |
|---------------------------|--------|-------|
| 1. 2 x SSPE; 0,1 % SDS    | 15 min | 42 °C |
| 2. 1 x SSPE; 0,1 % SDS    | 15 min | 42 °C |
| 3. 0,25 x SSPE; 0,1 % SDS | 15 min | 50 °C |

Danach wurde die Blot-Membran in Saranfolie eingeschlagen und auf einen Röntgenfilm (RX Nif, Fuji Films) bei -70°C in einer Kassette mit Verstärkerfolien exponiert. Nach aus der Kassette und zwei je einstündigen Waschungen in Sondenabwaschlösung bei 65°C konnte der Blot erneut hybridisiert werden.

*Folgende cDNAs fanden als Sonden Verwendung:*

Schweine-SGLT1 (pSGLT1, Ohta et al., 1990)	Nukleotide	156-1818
humaner SGLT3 (hSGLT3, Gorboulev, 1999)	Nukleotide	1730-2032
Schweine-RS1 (pRS1, Veyhl et al., 1993),	Nukleotide	577-1680
humaner OCT2 (hOCT2, Gorboulev et al., 1997)	Nukleotide	1-1703
humaner GLUT1 (hGLUT1, Mueckler et al., 1985)	Nukleotide	1-2856
Maus-RS1 (mRS1, Baumgarten, 1999)	Nukleotide	934-1234
Maus-SGLT1 (mSGLT1, Baumgarten, 1999)	Nukleotide	1-315
Maus-GLUT2 (mGLUT2, Asano et al., 1989)	Nukleotide	1580-1863
Maus-GLUT4 (mGLUT4, Kaestner et al., 1989)	Nukleotide	1626-1890
Maus-OCT1 (mOCT1, Schweifer et al., 1996)	Nukleotide	1624-1826
Maus-OCT2 (mOCT2, Mooslehner et al., 1999)	Nukleotide	1684-1975
Maus-Leptin: (m-Leptin, Chehab et al., 1995)	Nukleotide	88-145, 1876-
(wobei Nukleotide 145-1876 ein Intron bilden)		2232
humane Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	Nukleotide	197-806
(hGAPDH, # J02642) bezogen von der Firma Clontech, Heidelberg		

Hybridisierungslösung:

5X SSPE; 50 % (v/v) Formamid; 5X Denhardt; 0,5 % (w/v) SDS;  
20 µg/ml denaturierte Heringssperma DNA (frisch zugesetzt)

Sondenabwaschlösung:

5 mM Tris-HCl, pH 8; 2 mM EDTA; 0,1x Denhardt.

### 3.3.5 „Run-off“- Transkriptions-Assay

(Farrell et al., 1992; Tanaka et al., 1998)

#### 3.3.5.1 Isolation von Zellkernen für die RNA-Synthese

Konfluente LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen von Dr. Thomas Kühlkamp, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg, in 150 mm Schalen angezogen, wurden in PBS gewaschen und geerntet. Pro Petrischale wurden 3 ml Lysis-Puffer auf Eis hinzugegeben und die Zellen mit dem Zellschaber gelöst. Zur Lyse wurden die Zellen 20 min auf Eis inkubiert. Der Lysis-Puffer und die darin gelösten Zellen von je 2 Platten wurden vereinigt und 5 min bei 4000 xg und 4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Zellkerne wurden dreimal mit 1 ml Lysis-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Kerne konnten in einer Konzentration von 2-3 x 10<sup>7</sup> Kerne pro 50 µl Lagerungspuffer bei -70°C gelagert werden.

Lysis-Puffer:

0,01M Tris (pH 7,9), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 % Nonidet P40 (Sigma, Deisenhofen), 1 mM PMSF

Storage-Puffer = Lagerungspuffer:

0,02M Tris (pH 7,9), 0,075 M NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,85 mM DTT, 0,125 mM PMSF, 50 % Glycerol, 32 U/ml Ribonucleinase Inhibitor (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

#### 3.3.5.2 RNA Synthese und radioaktive Markierung

Zur RNA-Synthese wurden pro Assay 1 x 10<sup>7</sup> Kerne, d.h. 25 µl der gelagerten Kernsuspension, verwendet. Die Suspension wurden zur Abtrennung des Lagerungspuffers 5 min bei 4000 xg (4°C) zentrifugiert. Die Transkriptionsreaktion fand in 100 µl RNA-Synthese-Puffer für 30 min bei 37°C statt. Für die radioaktive Markierung der frisch synthetisierten mRNA wurden 250 µCi α-<sup>32</sup>P-dUTP (3000 Ci/mmol, ICN, Eschwege) und je 2 mM nicht markiertes ATP, CTP und GTP eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DNase I (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) in einer Endkonzentration 750 U/ml und 1 mM CaCl<sub>2</sub> gestoppt. Nach einer Inkubation von 5 min bei 23°C wurde eine Mischung mit folgenden Endkonzentrationen erstellt: 0,5 mg/ml Proteinase K (GibcoBRL, Karlsruhe), 0,33 mg Transfer-RNA aus der Hefe (Boehringer, Mannheim), 1,5 % SDS 10 mM EDTA 15 mM Tris (pH 7,4). Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 45°C. Die RNA wurde nun wie in 3.3.2.6 beschrieben mit 4 M Guanidiniumthiocyanat und zweimaliger Isopropanolfällung isoliert. Die gereinigte,

radioaktiv markierte RNA wurde in 200 µl TE-Puffer (3.1.4) resuspendiert. Je 2 µl der gelösten RNA wurden auf ein 1 cm<sup>2</sup> großes Whatman-Papier gegeben, das in ein Szintillationsgefäß gesteckt wurde. In diesem Gefäß wurde dann die Radioaktivität nach Cerenkov bestimmt (Elrick and Parker, 1968).

RNA-Synthese-Puffer:

0,1 M Tris (pH 7,9), 0,05 M NaCl, 0,4 mM EDTA, 350 mM NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 4 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,6 mM DTT, 50 µM PMSF, 250µg Heparinsulfat (Sigma), 0,5 U/ml Ribonucleinase Inhibitor (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

### 3.3.5.3 Immobilisierung von c-DNA

Die zu immobilisierenden cDNAs wurden aus dem Plasmid ausgeschnitten (3.3.3.1). Zur Restriktion wurden 40 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl eingesetzt. Die entsprechenden Restriktionsenzyme (Biolabs, Frankfurt a. M. oder MBI Fermentas, St. Leon-Rot) wurden in einer Konzentration 0,8 U/µl zugegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert.

*Folgende cDNAs fanden Verwendung:*

	Restirktionsenzym(e)
Schweine-SGLT1 (pSGLT1, Ohta et al., 1990) Nukleotide 156-1818	BAMH I, EcoRI
humaner OCT2 (hOCT2, Gorboulev et al., 1997), Nukleotide 1-1703	Hind III, Xho I
humaner GLUT1 (hGLUT1, Mueckler et al., 1985) Nukleotide 1-2856	BAMH I
Lac repressor aus E.coli (LacI, Gilbert et al., 1973) Nukleotide 1123-1629	Hap I, Mlu I
humane Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (hGAPDH, # J02642, Clontech, Heidelberg) Nukleotide 197-806	Apa I, Hind III

Die geschnittenen DNAs wurden Phenol/Chloroform extrahiert (3.3.2.2), präzipitiert (3.3.2.1), in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und einer Agarosegelelektrophorese (3.3.4.2) unterzogen. Die DNAs wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des DNA „Purifications Kit Easy Pure“ (Biozym, Hess.Oldendorf) aus dem Gelblock extrahiert (3.3.4.3). Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren konnte spektralphotometrisch ermittelt werden (3.3.4.1). Je 2 µg der aufgereinigten DNA wurden denaturiert und als Dots in Doppelproben auf eine Nylonmembran (Hybond N<sup>TM</sup>, Amersham, Braunschweig) übertragen und luftgetrocknet. Eine Bestrahlung mit UV-Licht (Stratalinker,

Stratagene, Lajolla, USA) und zusätzliches Backen bei 80°C für 2 h führte zur kovalenten Bindung der DNA an die Membran. Bis zur Hybridisierung konnte die Membran bei RT aufbewahrt werden.

#### 3.3.5.4 Hybridisierung des cDNA-Dot-Blots

Gleiche Mengen ( $5 \times 10^7$  cpm) der radioaktiv markierten RNAs (3.3.5.2) wurden für die Hybridisierung der Nylonmembranen, auf denen verschiedene cDNAs immobilisiert worden waren (3.3.5.3.), eingesetzt. Die Membranen wurden 2 h bei 42°C ohne Zugabe der radioaktiven Proben prähybridisiert. Die radioaktiv markierten RNAs wurden vor der Zugabe zu den Membranen 5 min bei 65°C denaturiert und 5 min auf Eis abgekühlt. Die Hybridisierung wurde in 4 ml Hybridisierungspuffer für 20 h bei 42°C durchgeführt. Die Stringenzbedingungen der nachfolgenden Waschschritte wurden sukzessive erhöht:

- |                              |        |       |
|------------------------------|--------|-------|
| 1. 2 x SSPE; 0,1 % SDS       | 15 min | 42 °C |
| 2. 2 x SSPE; 10µg/ml RNase A | 30 min | 37 °C |
| 3. 1 x SSPE; 0,1 % SDS       | 15 min | 42°C  |

In Saranfolie eingeschlagen wurde die Dot-Blot-Membran auf einen Röntgenfilm bei -70°C in einer Kassette mit Verstärkerfolien etwa 5 Tage exponiert.

Hybridisierungslösung:

- 5X SSPE; 50 % (v/v) Formamid; 5X Denhardt; 0,5 % (w/v) SDS;
- 25 µg/ml denaturierte Heringssperma DNA (frisch zugesetzt)
- 100 µg/ml denaturierte Polyadeylic Acid (Sigma, Deisenhofen)
- 0,5 mg/ml denaturierte t-RNA (Hefe) (Boehringer, Mannheim)

#### 3.3.6 Analyse der Transkriptionsrate

Um festzustellen, ob in den antisense LLC-PK<sub>1</sub>-Zelllinien generell die Transkription, völlig unspezifisch verändert ist oder ein spezifischer Effekt vorliegt, wurden die gesamten radioaktiv markierten RNAs auf eine Zunahme überprüft. LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen, mit dem pRcCMV Vektor (CON3) oder mit dem pRcCMV Vektor, der antisense RS1 enthielt (AS6 und AS8), stabil transfiziert, wurden in Gegenwart von 5 mM Glukose angezogen und 5 Tage nach Konfluenz geerntet. Nach Reinigung der Kerne wie unter 3.3.5.1 beschrieben wurden diese auch zu diesem Zweck mit radioaktiv markiertem  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dUTP und ATP, GTP, CTP 30 min inkubiert. Die Durchführung erfolgte unter identischen Bedingungen wie in Kapitel 3.3.5.2 dargestellt. Die synthetisierte, radioaktiv markierte RNA wurden nach Abstoppen der Reaktion über Reinigungssäulen von

dem restlichen freien radioaktiven  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dUTP abgetrennt. Dazu wurden Reinigungssäulen (Nunc Trap Probe Purifications Columns, Stratagene, Amsterdam, Niederlande) in eine spezielle Halterung (Push Column Beta Shield Device System, Stratagene, Amsterdam, Niederlande) eingespannt. Das Filtrat wurde in einem Szintillationsgefäß aufgefangen und dessen Radioaktivität im Counterzähler nach Cerenkov bestimmt (Elrick and Parker, 1968). Durch den Vergleich der Transkriptionsrate der „antisense-Zelllinien“ und der „Leervektor-Zelllinie“ ließ sich feststellen, ob eine generelle die Transkriptionsratenveränderung vorhanden ist oder ein spezifischer Effekt.

## 3.4 Proteinchemische Methoden

### 3.4.1 Erzeugung von polyklonalen Antikörper

#### 3.4.1.1 Kopplung des Peptids

(Harlow and Lane, 1988)

Die Synthese von antigenen Peptiden wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dieter Palm, Universität Würzburg durchgeführt.

Folgende Sequenzen kamen zum Einsatz:

Maus-RS:	GLSPDREDVRRSTESARKS-C	AS 436 - 454
Maus-SGLT1:	KDTIEIDTEAPQKKKG-C	AS 586 - 601
Humaner SGLT3:	EEKSQEETDDGVEEDYPES-C	AS 576 - 593
Schweine-SGLT1:	EAPEETIEIEVP EEKKG-C	AS 525 - 541

Die Herstellung der Maus- und Schweine-SGLT1 Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. Ulrich Karbach, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Würzburg, übernommen.

Zur Steigerung der Immunogenität wurden die Peptide über m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimidester (MBS, Sigma, Deisenhofen) an Ovalbumin (Sigma, Deisenhofen) gekoppelt. Dafür wurden 9 mg Ovalbumin in 9 ml 50 mM Phosphatpuffer 1 gelöst. Unter ständigem Rühren wurden langsam 10 mg MBS hinzugegeben, das vorher in 1 ml Dimethylformamid aufgenommen worden ist. Die Lösung wurde 30 min bei RT gerührt. Während dieser Prozedur durfte keine Trübung auftreten, die auf ausgefallenes Protein hinweist. Um ungekoppeltes MBS abzutrennen, wurde eine Gelfiltration mit einer „Sephadex G25“ Säule (PG 10, Biorad, München), die etwa 3,5 ml Lösung aufnehmen konnte, durchgeführt. Die Sepharosesäule wurde zunächst mit 9 ml 50 mM Phosphatpuffer 1 äquilibriert, dann wurden 3,3 ml des Proteingemisches aufgetragen und mit 6 ml 50 mM Phosphatpuffer 2 eluiert. Das Eluat wurde direkt beim

Auffangen in 1 ml fraktioniert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Danach wurde der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen bestimmt (3.4.3.1), die proteinreichsten Fraktionen wurden auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt und zur Mischung mit dem Peptid im Mengenverhältnis 1:1 verwendet. Das Peptid war zwischenzeitlich in PBS (1mg/ml) gelöst worden. Nach 3 h Rühren bei Raumtemperatur, konnte man von einer Kopplungseffizienz von 50 % ausgehen und das Antigen aliquotiert bei -70°C lagern.

0,4 M Phosphatpuffer 1:

46,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0

0,4 M Phosphatpuffer 2:

6,0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 44,0 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,0

### 3.4.1.2 Gewinnung von Antiseren

Zur Immunisierung wurden ca. 6 Monate alte Kaninchen eingesetzt. Vor Beginn des Immunisierungszyklus wurde den Tieren aus der Ohrarterie Blut zur Bestimmung des Präimmunserums abgenommen. Das gekoppelte Peptid (3.4.1.1) wurde im Verhältnis 4:1 mit PAO-Adjuvans gründlich emulgiert. Bei der Erstimmunisierung wurden 300-500 µg Antigen verwendet, dem zur Steigerung der Immunreaktion 100 µg Muramyl-dipeptid (Sigma, Deisenhofen, # A 9519) beigemischt worden sind. Die Injektion erfolgte intramuskulär unter das Schulterblatt. Bei weiteren Immunisierungen im Abstand von 21 Tagen wurden 250-300 µg Protein in PAO-Adjuvans eingesetzt. 10 bis 14 Tage nach der letzten Immunisierung wurde aus der Ohrarterie ca. 20 ml Blut entnommen. Das Blut musste 1 h bei RT gerinnen. Es konnte maximal 16 h bei 4°C vor der Weiterverarbeitung gelagert werden. Um das Serum vom restlichen Blut zu trennen, wurde es 20 min bei 4°C zentrifugiert (7000 xg). Das Serum wurde abgenommen, fraktioniert und bei -70°C oder -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Immunisierungserfolg wurde mittels ELISA überprüft (3.4.1.3). Konnte noch kein erwünschenswerter Titer festgestellt wurde, wurde das Tier einer I.V.-Immunisierung unterzogen. Hierbei wurden dem Tier dreimal je 70 µg des gekoppelten Peptids in einem Abstand von 3-4 Tagen direkt in die Ohrvene injiziert. 10 Tage später erfolgte wiederum eine Blutabnahme.

PAO-Adjuvans:

77 % (v/v) Polyalphaolefine, 17 % (v/v) Tween 81 (Sigma, Deisenhofen), 6 % Tween 80 (Sigma, Deisenhofen)

### 3.4.1.3. Titerbestimmung

(Catty, 1986)

Um die Reaktivität des Antikörperserums zu beurteilen, wurde ein für das antigene Peptid spezifischer ELISA (Enzym linked immunosorbent assay) durchgeführt. Die Verdünnung des Antiserums bei der eine halbmaximale Reaktionsstärke im ELISA erzielt werden konnte, wurde als Titer definiert.

Das ungekoppelte Peptid wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml in dem Koppelungspuffer gelöst. 150 µl dieser Lösung wurden pro Vertiefung auf eine 96 Loch-Mikrotiterplatte (Nunc Immuno™ Plate, MaxiSorp™ Surface, Dänemark) aufgetragen und 16 h bei 4°C inkubiert. Die beschichtete Platte wurde auf Raumtemperatur gebracht, entleert und mit 200 µl Blockpuffer pro Vertiefung versehen. Nach 2 h bei RT wurde dreimal 5 min mit Waschpuffer inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte mit einer Verdünnungsreihe (von 1: 400 bis 1: 204 800) des Antiserums in Blockpuffer mit je 100 µl pro Vertiefung beschichtet. Nach einer Einwirkungszeit von 16 h bei 4°C wurde die Platte dreimal 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Ein anti-rabbit-IgG F(ab')<sub>2</sub>-Fragment alkalische Phosphatase-Konjugat aus der Ziege (Sigma, Deisenhofen, # A 3937) wurde 1:250 in Blockpuffer verdünnt, davon wurden 100 µl pro Vertiefung aufgetragen und 4 h bei RT inkubiert.

Die Mikrotiterplatte wurde wieder dreimal gewaschen und 5 min bei RT mit 100 µl pro Vertiefung Äquilibriumspuffer beschichtet. Der Äquilibriumspuffer wurde ausgeleert und durch 100 µl pro Vertiefung Substratlösung ersetzt. Nach 1 h wurde die Reaktion durch 100 µl je Vertiefung einer 100 mM EDTA-Lösung (pH 8,0) gestoppt. Mit dem ELISA-Reader (Multiskan Plus, Titertek) wurden die Extinktionswerte bei 405 nm, korrigiert durch die Extinktion bei 450 nm, gemessen. Aus dem Abfall der Extinktionswerte bei Zunahme der Verdünnungsstufen konnte der Titer des Antiserums bestimmt werden.

Kopplungspuffer:

100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6

Blockpuffer:

PBS, 200 mM NaCl, 0,5 % (w/v) BSA, 0,1 % NaN<sub>3</sub>, pH 7,4

Waschpuffer:

PBS, 200 mM NaCl, 0,05 % (w/v) Tween 20, pH 7,4

Äquilibriumspuffer:

150 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH 9,8

Substratlösung:

150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> (frisch zugegeben), 100 mM Tris/HCl, pH 9,8

1mg/ml Sigma 104 Substrat (Para-Nitrophenylphosphat) (Sigma, Deisenhofen)

#### 3.4.1.4 Affinitätsreinigung von Antisera

(Domen et al., 1990)

Die Affinitätsreinigung wurde mittels eines „SulfoLink Kits“ (Pierce, Bonn, # 44895) durchgeführt. Für die Immobilisierung des Peptids über ein terminales Cystein oder eine zugängliche SH-Gruppe, war eine vorherige Reduzierung nötig. Zu diesem Zweck wurden 10 mg „Cleland's Reductacryl“ (auf Polyacrylamid immobilisiertes DTT, Calbiochem, Darmstadt, # 233157) in 500 µl PBS gelöst und durch Zugabe von 20 µl einer 0,1 % Natriumborhydrid- ( $\text{NaBH}_4$ )- Lösung seinerseits selbst reduziert. Nach 15 min Inkubation wurde durch Zugabe von 100 µl 1M Essigsäure überschüssiges Natriumborhydrid entfernt. Durch kurzes Anzentrifugieren sedimentierte das Reductacryl, wurde dreimal mit Wasser gewaschen und in 100 µl PBS aufgenommen, wenn nötig wurde der pH-Wert auf 7,5 korrigiert. 5 mg des zu reduzierenden Peptids wurden in 1 ml Probenpuffer (Sample Preparations Buffer, SulfoLink Kit) gelöst und zu dem reduzierten Reductacryl gegeben. Nach einer Inkubation von 15 min konnte das Reductacryl abzentrifugiert werden, im Überstand befand sich das reduzierte Peptid. Währenddessen konnte die im Kit enthaltene Säule (Coupling Gel Column) äquilibriert werden. Die Säule wurde auf Raumtemperatur gebracht, erst oben, dann unten geöffnet, der Lagerungspuffer abgelassen und mit 12 ml Kupplungspuffer (Coupling Buffer, SulfoLink Kit) gespült. Nach Verschluss der Unterseite der Säule wurde das reduzierte Peptid aufgetragen. Der Deckel wurde verschlossen, die Säule 15 min bei RT über Kopf geschüttelt und dann 30 min bei RT ruhen gelassen. Die Säule wurde geöffnet, lief leer und wurde mit 6 ml Kupplungspuffer gespült. Um ungebundene Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Säule unten verschlossen und 15,8 mg L-Cystein, in 2 ml Kupplungspuffer gelöst, eingefüllt. Die Säule wurde wiederum verschlossen, 15 min über Kopf bei RT geschüttelt und 30 min in Ruhe inkubiert. Die Säule wurde geöffnet, geleert und mit 16 ml Waschlösung (Wash Solution, SulfoLink Kit) gespült. Nachfolgend wurde die Säule mit 12 ml 0,05 % Natriumazidlösung ( $\text{NaN}_3$ ) gewaschen und eine Serum-Filterscheibe (SulfoLink Kit) auf die Gelmatrix aufgebracht. Die Säule wurde mit 2 ml 0,05 % Natriumazidlösung gefüllt, gut verschlossen und so bei 4°C gelagert.

Für die Aufreinigung eines Antikörpers wurden Säule und Serumprobe auf Raumtemperatur gebracht. Die Säule wurde geöffnet, lief leer und wurde mit 16 ml PBS gespült. 1- 1,5 ml Serum wurde auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde unten verschlossen und 200 µl Probenpuffer hinzugegeben. Komplet verschlossen, folgte eine Inkubationszeit von 1 h bei RT, danach wurde die Säule mit 16 ml PBS gespült. Der Antikörper wurde mittels 8 ml 100 mM Glycinpuffer eluiert und in sechzehn 500 µl Einheiten aufgefangen. In den Eppendorfgefäßen zur Fraktionierung waren 25 ml

einer 1 M Tris/HCl-Lösung (pH 9,5) zur Neutralisierung vorgelegt worden. Der Titer der einzelnen Fraktionen wurde mit Hilfe eines ELISAs (3.4.1.3) bestimmt.

Die Säule konnte mit 16 ml PBS regeneriert, mit 6 ml 0,05 % Natriumazidlösung gespült und mit 2 ml 0,05 % Natriumazidlösung gefüllt bei 4°C gelagert werden. Die Säule konnte mehrfach zur Antikörperaufreinigung verwendet werden.

#### **3.4.1.5 Lagerung affinitätsgereinigter Antisera**

Aufgereinigte Antikörper konnten mit einer Endkonzentration von 0,01 % Natriumazidlösung ( $\text{NaN}_3$ ) über mehrere Wochen bei 4°C oder 1:1 mit Glycerol (Fluka, Deisenhofen) versetzt über mehrere Monate bei -20°C gelagert werden.

### **3.4.2 Isolation von Gewebs- und Zellfraktionen**

#### **3.4.2.1 Differenzielle Fraktionierung von Gewebe**

(Rickwood, 1984)

Zur Gewinnung von Gesamtmembranen wurde das in flüssigem Stickstoff ( $\text{N}_2$ ) schockgefrorene Gewebe mit einem Mörser zerrieben. Das pulverisierte Gewebe wurde in 1 ml Saccharose-Puffer pro 100 mg Gewebe aufgenommen und bei 4°C mit einem Potter homogenisiert. Zelltrümmer wurden mittels einer Zentrifugation von 10 min, 150 xg, 4°C abgetrennt, Zellkerne und Mitochondrien wurden durch eine 2000 xg Zentrifugation des 150 xg Überstandes (10 min, 4°C) pelletiert. Eine weitere Zentrifugation des 2000 xg Überstandes für 60 min bei 40000 xg ergab im Sediment eine mit Plasmamembran angereicherte Fraktion. Die erhaltenen Membranen wurden in einer angemessenen Menge Saccharose-Puffer resuspendiert und bei -70°C gelagert.

1x Proteinase Inhibitor Mix:

5 µg/ml Aprotinin (Fluka, Deisenhofen), 5 µg/ml Leupeptin (Fluka, Deisenhofen), 1 mM Benzamidin (Sigma, Deisenhofen)

Saccharose-Puffer:

280 mM Saccharose, 5 mM EGTA, 5 mM  $\text{MgSO}_4$ , 20 mM Tris/HCl pH 7,5

1 mM PMSF (frisch zugesetzt), 1x Proteinase Inhibitor Mix (frisch zugesetzt)

### 3.4.2.2 Gewinnung von Bürstensaummembranen

(Koepsell and Seibicke, 1990)

Zur Gewinnung von Bürstensaummembranen (BBMs) wurden 10 Mäusenieren in Ringerlösung auf Eis gesammelt. Das Gewebe wurde in 9 ml pro g Gewebe TM-Puffer 5 min im Messerhomogenisator fein zerkleinert. Nach tropfenweiser Zugabe von 1 M  $\text{CaCl}_2$  bis zu einer Endkonzentration von 10 mM ließ man die Suspension 15 min auf Eis inkubieren. Bei 1750 xg (12 min, 4°C) wurden zunächst die Zelltrümmer abzentrifugiert, darauf folgend bei 18000 xg (12 min, 4°C) die Zellmembranen pelletiert, die in 1/10 ihres Ausgangsvolumens TM-Puffer resuspendiert wurden. Nach erneuter Zugabe von 1 M  $\text{CaCl}_2$  bis zu einer Endkonzentration von 10 mM und einer Inkubationszeit von 15 min auf Eis wurde für 12 min bei 3500 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und daraus bei 20000 xg innerhalb von 12 min die Membranen sedimentiert, die in 1/100 ihres Ausgangsvolumens TRA-Puffer aufgenommen wurden. Mittels einer Zentrifugation von 48000 xg für 20 min (4°C) wurden die Bürstensaummembranen pelletiert und in 1/200 des Ausgangsvolumens TRA-Puffer aufgenommen. Aliquotiert konnten die BBMs bei -70°C oder -196°C gelagert werden.

Ringerlösung: 150 mM NaCl, 4 mM KCl, 3 mM  $\text{CaCl}_2$

TM-Puffer: 10 mM Mannit, 2 mM Tris/HCl (pH 7,1)

frisch zugegeben: 1 mM Benzamidin, 1 mM PMSF, 0,1 mM DFP, 500  $\mu\text{l/l}$  Trasylol, 1 mg/l Leupeptin

TRA-Puffer: 10 mM Triethanolaminhydrochlorid, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin (pH 7,4)

frisch zugegeben: 1 mM Benzamidin, 0,1 mM PMSF, 0,1 mM DFP, 500  $\mu\text{l/l}$  Trasylol, 10 mg/l Leupeptin

### 3.4.2.3 Differenzielle Fraktionierung von *Xenopus laevis* Oozyten

(Geering et al., 1989; Valentin, et al., 2000)

Die Gewinnung der Membranfraktion c-RNA injizierten Oozyten erfolgte durch Differentialzentrifugation. Drei bis fünf Tage nach der Injektion, die von Dr. Christopher Volk, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg übernommen wurde, wurden die Oozyten in Homogenisierungspuffer (8  $\mu\text{l}$ /Oozyte) aufgenommen, mechanisch zerdrückt und mehrfach durch eine gelbe Eppendorfspitze pipettiert. Durch zweimalige Zentrifugation bei 1000 xg für 10 min (4°C) wurden Trümmer und Dotterschollen durch Sedimentation entfernt. Auf dem Überstand schwimmende Dotterpro-

teinschollen wurden mit einem Wattestäbchen abgenommen. Das geklärte Homogenisat wurde bei 40000 xg 1 h bei 4°C zentrifugiert, um die Membranfraktion zu sedimentieren. Die Membranen wurden in 0,7 µl/Oozyte Homogenisierungspuffer resuspendiert und bei -70°C gelagert.

Homogenisierungspuffer:

83 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, pH 7,9

1 mM PMSF (frisch zugesetzt), 1x Proteinase Inhibitor Mix (frisch zugesetzt)

#### **3.4.2.4 Isolation von Mäuse-Blutserum**

Zur Analyse der Peptidhormone Leptin und Insulin wurde aus der Schwanzspitze von RS1-knock-out Mäusen und Kontrollmäusen Blut entnommen. Die Blutproben ließ man 30 min bei RT ruhen und zentrifugierte sie 10 min bei 6000 xg (RT). Danach wurden sie sofort bei -20°C eingefroren.

#### **3.4.2.5 Homogenisierung von Fettgewebe**

Zur Analyse des Leptingehalts mittels Western-Detektion (3.4.3.4) und ELISA (3.4.5) wurde aus RS1-knock-out Mäusen bzw. Kontrollmäusen Fettgewebe aus dem Bauchraum entnommen. Das in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Gewebe wurde mit einem Mörser zerrieben, in 1 ml Saccharose-Puffer pro 100 mg Gewebe aufgenommen und bei 4°C mit einem Potter gründlich homogenisiert. Zelltrümmer wurden mittels zweimaliger zehnmütiger Zentrifugation bei 150 xg und 4°C abgetrennt. Die erhaltene Suspension wurde bei -70°C gelagert.

Saccharose-Puffer:

280 mM Saccharose, 5 mM EGTA, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Tris/HCl pH 7,5

1 mM PMSF (frisch zugesetzt), 1x Proteinase Inhibitor Mix (frisch zugesetzt)

### 3.4.3 Analyse von Proteinen

#### 3.4.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

(Bradford, 1976)

Proteinkonzentrationen wurden mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 (Bio-Rad, München) ermittelt. 100 µl der Proteinprobe, deren erwartete Proteinkonzentration 0,1 µg/µl nicht übersteigen sollte und die höchstens 0,1 % (v/v) Triton X-100 enthalten sollte, wurden mit 1 ml des 1:5 in Wasser verdünnten Farbstoff-Reagenz-Konzentrats (Bio-Rad, München, #500-0006) versetzt. Die Reaktion der phosphorsäuren Lösung von Coomassie Brilliant Blau G-250 mit basischen oder aromatische Aminosäuren führte zu einer Blaufärbung der Nachweislösung. Als Vergleichsstandard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe verwendet. Nach 5 bis 30 min wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen und um den Extinktionswert des Leerwerts (Pufferlösung) korrigiert.

#### 3.4.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(SDS-PAGE, Laemmli, 1970)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine weitgehend unabhängig von ihren Eigenschaften wie Ladung und Struktur nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Eine wichtige Voraussetzung für diese Art der elektrophoretischen Trennung ist die Denaturierung und gleichmäßige Solubilisierung der Proteine mit Sodiumdodecylsulfat (SDS).

Die zu untersuchenden Proben wurden im Volumenverhältnis 1:1 mit Probenpuffer (2x) bei 37°C für 45 - 60 min inkubiert. Durch Verwendung eines Phosphatpuffers anstelle eines Tris-Puffers wurde die Gefahr einer Spaltung von Asp-Proteptidbindungen verhindert (Kowit and Maloney, 1982).

Die Verwendung eines diskontinuierlichen Gelsystems mit einem Sammel- (pH 6,8) und einem Trenngel (pH 8,8) erlaubte eine optimale Trennschärfe der Proteine. Der PAA-Gehalt des Sammelgels betrug 5 %, der des Trenngels wurde je nach erwarteter Molekulargröße des zu untersuchenden Proteins zwischen 8 % und 17 % gewählt. 80 x 85 x 0,8 mm vertikale Polyacrylamid-Minigele wurden hergestellt, indem das Trenngel zwischen die beiden Glasplatten (Biometra, Göttingen) gegossen und mit n-Butanol überschichtet wurde.. Nach 30-minütiger Polymerisation wurde das n-Butanol entfernt, das Sammelgel eingefüllt und zur Ausbildung von Probetaschen mit einem Kamm versetzt. Die Polymerisierung der beiden Gele wurde durch Zugabe von 50 µl 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) und 5 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)

gestartet. Das fertige Gel konnte einige Tag in Saranfolie eingepackt bei 4°C gelagert werden.

Nach Beladung der Geltaschen mit Proteinproben betrug die Spannung für die Fokussierung im Sammelgel 80 V und für die spätere Trennung 120 V. Zur Analyse des Molekulargewichts wurden mit den Proben 5 µl eines Proteingrößenstandards aufgetragen. Es wurde für den Bereich zwischen 10 und 200 kDa ein „BenchMark prestained Protein Ladder“ der Firma GibcoBRL (Karlsruhe) oder für den Bereich zwischen 2 und 100 kDa ein „SeeBlue prestained Standard“ der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande) verwendet.

Probenpuffer 2x (modifiziert nach Laemmli):

0,5 M β-Mercaptoethanol, 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerol, 0,001 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 M Natrium-Phosphat, pH 6,8

Elektrophoresepuffer :

24,8 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS.

Trenngel: 8 % - 17 % PAA; 0,1 % (w/v) SDS, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8

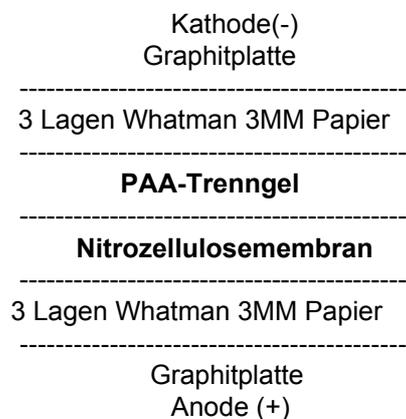
Sammelgel: 5 % PAA; 0,1 % (w/v) SDS, 125 mM Tris-HCl pH 6,8

### 3.4.3.3 Elektrotransfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamid-Gelen

(Kyhse-Andersen, 1984)

Zur Übertragung der Proteine aus SDS-PAA-Gelen auf Nitrozellulosemembranen (Hybond ECL, Amersham, Freiburg) wurde das „semi-dry“-Verfahren benutzt. Dazu fand eine horizontale Blot-Apparatur mit zwei Graphitplatten-Elektroden (Novablot, Pharmacia, Freiburg) Verwendung.

Die Schichtung zwischen den Graphit-Elektroden war wie folgt::



Die Blotmembran und die Whatman-Papiere wurden zuvor in Transferpuffer getränkt. Der Transfer erfolgt bei Raumtemperatur und einer Stromstärke von 1,3 mA/cm<sup>2</sup> innerhalb von 120 min.

Transferpuffer:

25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol, pH 8,3

#### 3.4.3.4 Western-Blot-Detektion

(Towbin et al., 1979)

Der Nachweis von Proteinen erfolgte entweder mit selbsterzeugten, affinitätsgereinigten Peptid-Antikörpern (3.4.1.) oder mittels käuflicher Antikörper:

Maus GLUT 2: rabbit anti-rat Glut-2 Antibody, affinitätsgereinigt, DPC Biermann, Bad Nauheim (# GT21-A) (Alpha-Diagnostic International, San Antonio, USA)

Maus GLUT 4: rabbit anti-mouse Glut-4 Antibody, affinitätsgereinigt, DPC Biermann, Bad Nauheim (# GT41-A) (Alpha-Diagnostic International; San Antonio, USA)

Maus Leptin: Ob(A-20) rabbit anti-human Leptin Antibody, affinitätsgereinigt, Santa Cruz, Kanada (# sc-842)

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrozellulosemembran, auf die Proteine transferiert worden sind, 1 h mit Blockierungslösung auf einem Taumelschüttler bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Blockierungslösung abgezogen und der affinitätsgereinigte Antikörper je nach Titer in einer Verdünnung von 1:50 bis 1:200 in einem Volumen von 10 ml Blockierungslösung zugesetzt. Die Membran wurde mit der Antikörper-Blockierungslösung in Plastikfolie eingeschweißt und 16 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Plastikfolie entfernt und nicht gebundener Antikörper durch drei 15-minütige Waschschriffe in 2 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T entfernt. Darauf schloss sich die Detektion mit dem Zweitantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-IgG-POX-Konjugat, #A0545, Sigma, Deisenhofen) an, welcher 1:5000 in Blockierungslösung verdünnt eingesetzt wurde. Nach einstündiger Inkubation bei 4°C folgte erneutes dreimaliges 15-minütiges Waschen mit Blockierungslösung bei RT. Man ließ die Membran abtropfen und brachte sie nach Angaben des Herstellers für 1 min bei RT mit dem „Enhanced chemoluminescenc-Reagenz“ (ECL, Amersham, Freiburg) in Kontakt. Die Blotmembran wurde in Saranfolie eingeschlagen und 1 bis 45 min in einer Kassette auf einem Röntgenfilm (RX Nif, Fuji Films) exponiert.

Um die Spezifität des Antikörpers zu kontrollieren, wurde der affinitätsgereinigte Primärantikörper mit 100 µg/ml des ungekoppelten Peptids für 1 h bei 37°C präabsorbiert und parallel zu dem entsprechenden nicht präabsorbierten Antikörper verwendet.

TBS-T:

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,05 % (v/v) Tween 20

Blockierungslösung:

2 % (w/v) Magermilchpulver (Fluka, Deisenhofen) in TBS-T

### 3.4.4 Immunfluoreszenz

#### 3.4.4.1 Einfachmarkierung

(Karbach et al., 2000)

Die Gewebeschnitte wurden mit einem Kryotom der Firma Leica (Jung CM 3000) bei Temperaturen von -24°C bis -15°C je nach Gewebe (nach Angaben der Firma Leica, Nussloch) mit einer Schichtdicke von 5 µm erstellt. Dazu wurde das in Isopentan schockgefrorene Gewebe mit einem Gewebekleber „Tissue Tek“ (Sakura Finetek, Vogel GmbH & Co.KG, Giessen) aufgeklebt. Die Schnitte wurden auf silanisierten Objektträger (3.1.3) aufgenommen, 5 min in 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS (pH 7,0) oder alternativ in eisgekühltem Aceton fixiert und direkt weiter verarbeitet. Nach 15minütigem Waschen mit PBS-T wurden die Gewebeschnitte mit einem Fettstift (DAKO, Hamburg) umrandet. In der Feuchtekkammer aufgereiht wurden unspezifischen Bindungsstellen durch eine 30minütige Inkubation mit Blocklösung blockiert. Die affinitätsgereinigten Antikörper (m-RS, mSGLT1, pSGLT1 oder hSGLT3 (3.4.1)) wurde je nach Titer in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:200 in einem Volumen von 200 µl Blockpuffer pro Objektträger aufgetragen. Zur Anfärbung der Kern-DNA wurden zusätzlich in den Blockpuffer 5 µl/ml einer DAPI-Stammlösung gemischt (Takata et al., 1992). Die Inkubationszeit betrug 16 h bei 4°C in PBS-T-Atmosphäre. Es schlossen sich 3 Waschschrte á 5 min in PBS-T an. Der Sekundärantikörper, ein mit Indocarbocyanin (Cy3) konjugierter anti-rabbit-IgG-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment Antikörper aus der Ziege (# 111-116-003, Dianova, Hamburg) wurde 1:2000 in Blockpuffer verdünnt auf die Objektträger aufgebracht. Ab der Sekundärantikörperreaktion fanden alle Schritte lichtgeschützt statt. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde wieder dreimal 5 min mit PBS-T gewaschen. Die Objekte konnten mit „Fluorescent Mounting Medium“ (Dako, Hamburg) eingedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot 2, Zeiss, Jena; 3.9.1) oder unter dem konfokalen Laserscanmikroskop (LSM 510 La-

serscangerätes an einem Axiovert 100, Zeiss, Jena; 3.9.2) betrachtet werden. Für längere Haltbarkeit wurden die Schnitte mit Nagellack versiegelt und bei 4°C aufbewahrt.

Zum Ausschluss unspezifische Reaktionen des Sekundärantikörpers mit dem Gewebe dienten Parallelversuche, in denen der Primärantikörper weggelassen wurde. Um die Spezifität des Antikörpers zu testen, wurde der affinitätsgereinigte Primärantikörper in seiner Arbeitsendkonzentration mit 100 µg/ml des ungekoppelten Peptids für 1 h bei 37°C präabsorbiert und parallel zu dem entsprechenden nicht präabsorbierten Antikörper verwendet.

PBS-T:

PBS, 0,05 % Tween 20

Blocklösung:

PBS, 0,1 % Triton X-100, 2 % Magermilchpulver

DAPI-Stammlösung:

200 µg 4,6-Diamidino-2Phenylindoldichlorid (Sigma, Deisenhofen, # 9542) in 1 ml H<sub>2</sub>O gelöst und 1:1 mit Glycerol versetzt, Lagerung -20°C

#### **3.4.4.2 Doppelmarkierung**

(Arrizabalaga et al., 1989)

Für eine genaue Einordnung des Signals des h-SGLT3-Antikörpers im menschlichen Muskel- und Duodenumgewebe war eine Doppelmarkierung notwendig. Dazu wurde ein monoklonaler anti-mouse-IgG1-Antikörper gegen den humanen Acetylcholin Rezeptor (beta subunit) (# SM1447, DPC Biermann, Bad Nauheim) verwendet. Prinzipiell wurde die Immunfluoreszenz genauso durchgeführt wie unter 3.4.4.1 beschrieben. Der zusätzliche Antikörper wurde dem Primärantikörper gegen den humanen SGLT3 in einer Konzentration von 1:3 beigemischt und auf das Gewebe aufgetragen. Als Sekundärantikörper diente ein mit Carbocyanin (Cy2) konjugierter anti-mouse-IgG-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment Antikörper (# 115-226-062, Dianova, Hamburg) in einer Konzentration von 1:200 und der bereits beschriebene Cy3 gekoppelte Antikörper. Die Inkubationszeit der Sekundärantikörper verlängerte sich auf 2 h.

### 3.4.5 Detektion von Leptin mittels ELISA

Maus-Leptin wurde in Blutseren (3.4.2.4), in Fettgewebshomogenisaten (3.4.2.5) oder in Kulturmedien von Fettgewebsexplantaten (3.6.3) abgesondert mit einem „ACTIVE™ Muriner Leptin ELISA“ (Diagnostic Systems Laboratories (DSL), Sinsheim, # DSL-10-24100) nachgewiesen. In diesem “two-step“ Sandwich-Immunoassay wurden die zu untersuchenden Proben auf einer vom Hersteller mitgelieferten Mikrotitrationsplatte mit einem anti-murinen Leptin-Antikörper (im Kit enthalten), der an eine Horseradish Peroxidase gekoppelt war, inkubiert. Wobei die Mikrotitrationsplatte selbst bereits mit einem anderen anti-murinen Leptin-Antikörper beschichtet war.

Bei der Durchführung wurden die Angaben des Herstellers befolgt. 100 µl der zu analysierenden Proben sowie je 100 µl einer Standardreihe (0,25; 0,5; 1,5; 5,0; 15,0 und 50,0 ng/ml Leptin) wurden in die Vertiefungen der Mikrotitrationsplatte pipettiert. Nach Zugabe von 50 µl „Assay Buffer“ (im Kit enthalten) je Vertiefung wurde die Mikrotiterplatte 3 h bei RT auf einem horizontalen Schüttler bei 500-700 rpm inkubiert. Die Platte wurde danach fünfmal gewaschen, mit 100 µl Antikörper-Enzym Konjugat pro Vertiefung beschichtet und 1 h bei 500-700 rpm inkubiert. Die ELISA-Platte wurde wieder fünfmal gewaschen und mit je 100 µl Tetramethylbenzidin-Chromogen Substrat-Lösung 10 min lichtgeschützt mit 500-700 rpm geschüttelt. Durch Zugabe von 100 µl schwefelsaurer Lösung je Vertiefung wurde die enzymatische Farbreaktion gestoppt. Die Extinktionswerte der Reaktion wurden bei 450 nm mit dem ELISA-Reader (Multiskan Plus, Titertek) gemessen.

### 3.4.6 Detektion von Insulin mittels ELISA

Zum Nachweis von Maus-Insulin in Blutseren (3.4.2.4) wurde ein „rat Insulin ELISA“ (CrystalChem, Chicago, USA, # INSKR020) durchgeführt. In diesem Enzym-Immunoassay wurden die zu untersuchenden Proben auf einer Mikrotitrationsplatte mit einem im Meerschweinchen hergestellten Maus/Ratten-anti-Insulin Antikörper, der an eine Horseradish Peroxidase gekoppelt war (Kit), inkubiert. Die vom Hersteller gelieferte Mikrotitrationsplatte selbst war mit einem anderen monoklonalen Maus-anti-Insulin Antikörper beschichtet.

Bei der Durchführung wurden die Angaben des Herstellers befolgt. Die Mikrotiterplatte wurde zunächst gewaschen und dann mit 50 µl anti-Insulin Antikörper aus dem Meerschweinchen pro Vertiefung beschichtet (Kit). 50 µl der zu untersuchenden Proben sowie je 50 µl einer Standardreihe (39; 17; 156; 313; 625; 1250; 2500 pg/ml Insulin) wurden in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert und über Nacht bei 4°C

inkubiert. Die Platte wurde dreimal gewaschen, dann mit je 100 µl Antikörper-Enzym Konjugat (ein mit einer Horse-radish-Peroxidase konjugierter Antikörper gegen das Meerschweinchen) beschichtet und 3 h bei RT ruhen gelassen. Die ELISA-Platte wurde wieder dreimal gewaschen und jede Vertiefung mit 100 µl o-Phenylendiamin-Lösung 30 min lichtgeschützt inkubiert. Durch Zugabe von je 50 µl schwefelsaurer Stopplösung wurde die enzymatische Reaktion gestoppt und die Extinktionswerte bei 492 nm, korrigiert durch die Extinktion bei 630 nm, mit dem ELISA-Reader (Multiskan Plus, Titertek) gemessen.

## **3.5 Untersuchungen des Lipidstoffwechsels**

### **3.5.1 Untersuchung von Parametern des Lipidstoffwechsel im Blut**

Für Untersuchungen von Fettstoffwechselfparameter wurden Blutseren von Mäusen verwendet, die wie unter 3.4.2.4 beschrieben isoliert worden waren. Die Untersuchungen wurden durch das Labor von Frau Dr. Biemer-Daub, Aventis Pharma, Frankfurt übernommen. Glukose, Triglyceride, Cholesterin, HDL-Cholesterol und LDL-Cholesterol wurden mit käuflichen Kits der Firma Roche, Mannheim analysiert. Freie Fettsäuren mittels eines Kits der Firma Wako, Neuss und Glycerin- und Hydroxybutyratwerte durch Kits der Firma Randox, Crumlin, UK. Bei der Durchführung wurden die Angaben des jeweiligen Herstellers befolgt und die entsprechenden Extinktionswerte der enzymatischen Testsysteme mit dem Gerät Hetaschi 912 gemessen. Bei den Testsystemen ist darauf hinzuweisen, dass sie auf das humane System validiert waren.

### **3.5.2 Analyse der Fettzellgröße**

Um die Größe von Fettzellen analysieren zu können, wurde aus RS1-knock-out Mäusen bzw. Kontrollmäusen nach Genickbruch Fettgewebe aus dem Bauchraum entnommen. Dieses Fettgewebe wurde in ein Eponharz eingebettet. Mit dem Kryotom wurden semidünne Schnitte erzeugt, unter dem Mikroskop fotografiert (3.9.1) und statistisch ausgewertet. Einbettung und Gewebeschnitte wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Georg Krohne, Zoologie, Universität Würzburg durchgeführt.

Das Fettgewebe wurde nach der Entnahme mit einer Rasierklinge zerkleinert und auf Eis 45 min mit 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd und 2 % (v/v) Formaldehyd fixiert. Das Gewebe wurde nachfolgend fünfmal für je 3 min in 50 mM Cacodylatpuffer (pH 7,2)

auf Eis gewaschen. Zur Fixierung wurde 90 min mit 2 % (w/v) Osmiumtetroxid ( $\text{OsO}_4$ ) in Cacodylatpuffer auf Eis inkubiert. Das Gewebe wurde fünfmal für je 3 min in Wasser auf Eis gewaschen. Dann folgte eine Entwässerungsreihe. Das Gewebe wurde auf Eis nacheinander jeweils für 30 min mit 50 % (v/v), 70 % (v/v), 90 % (v/v), 96 % (v/v) und dann mit 100 % Ethanol inkubiert. Bei zwei weiteren Inkubationsschritten mit 100 % Ethanol und drei weiteren mit Propylenoxid für jeweils 30 min wurden die Präparate auf Raumtemperatur gebracht. In einem Gemisch aus Propylenoxid und Epon 812 (1:1) wurden die Gewebeproben über Nacht offen im Abzug bei RT stehen gelassen. Das Gewebe wurde für 2 h bei RT in Epon 812 (Sigma, Deisenhofen) umgebettet. Nach einer zweiten Inkubation für 2 h in Epon 812 wurde das Gewebe in eine Einbettungsform gegeben mit Epon 812 versehen und 48 h zur Polymerisation in einen Ofen bei 60°C gestellt. Nach der Polymerisation wurden Semidünnschnitte (0,5  $\mu\text{m}$ ) erzeugt, die auf Objektträger aufgebracht und mit Eponharz eingedeckelt wurden. Die Objektträger wurden zur Polymerisation ebenfalls bei 60°C für 24 h in den Ofen gegeben.

Die Objektträger wurden nun unter dem Mikroskop betrachtet und fotografiert (3.9.1). Die relativen Schnittflächen (F) der Fettzellen von Wildtypmäusen und RS1-knock-out Mäusen wurden ermittelt, indem die Schnittpunkte der Fettzellränder mit einem aufgelegten Rasterfeld gezählt wurden. Um die Volumina (V) der Fettzellen von RS1-knock-out Mäusen und Wildtypmäusen zu vergleichen, wurde die Vereinfachung angenommen, dass die Fettzelle eine Kugelform besitzt. Die Volumina wurden nach folgender Formel berechnet:

$$V = \frac{3}{4} \pi (\sqrt{F/\pi})^3$$

### 3.5.3 Analyse des der Körperzusammensetzung

(Halaas et al., 1995)

Um feststellen zu können, ob RS1-knock-out Mäuse eine größere Fettmasse besitzen als die Kontrollmäuse wurde die Körperzusammensetzung analysiert. Nach Genickbruch wurden die Tiere gewogen und 5 Tage bei 90°C getrocknet bis das Gewicht konstant war. Jede Maus wurden erneut gewogen und in einem Messerhomogenisator in 300 ml Chloroform:Methanol (3:1) gut zerkleinert. Die Suspension wurde filtriert (Faltenfilter: Schleicher & Schuell, Dassel) und die extrahierte, zerkleinerte Maus im Abzug bei RT über Nacht getrocknet und danach gewogen. Das Körperwasser errechnete sich aus der Differenz zwischen ungetrocknetem und getrocknetem

Körpergewicht. Zur Kalkulation der Fettmasse wurde die Differenz aus getrocknetem Körpergewicht und dem Gewicht des extrahierten Tieres verwendet.

## 3.6 Kulturtechniken

### 3.6.1 Kultur von LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen

Als Nährmedium diente „Dulbecco's modified Eagle's medium“ (DMEM, Sigma, Deisenhofen), das 5 mM Glukose enthielt, mit 4 mM L-Glutamin (Sigma, Deisenhofen), 10 % (v/v) fetales Rinderserum (FCS, Sigma) und 100 U/ml Penizillin + 0,1 mg/ml Streptomycin (Sigma). Die Zellen wurden bei 37°C, 5 %iger Kohlendioxid- und wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Waren die Zellen konfluent, wurden sie weiter passagiert. Das Ablösen der adhärenen LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen geschah trypsinfrei unter Verwendung von Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freiem „Dulbecco's phosphate-buffered saline“ (Sigma, Deisenhofen), das mit 28 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,02 % (w/v) EDTA und 10 mM HEPES, (pH 7,4) supplementiert war (Kimmich et al., 1994). Nach 30minütiger Inkubation wurden die Zellen 10 min bei 250 xg pelletiert, resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:4 gesplittet.

### 3.6.2 Anlegen von Kryokulturen von LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen

Die Zellen wurden trypsinfrei abgelöst, herunterzentrifugiert (10 min, 250 xg), in Kryomedium in einer Zelldichte von etwa 10<sup>6</sup> pro ml resuspendiert und sofort für 24 h bei -20°C eingefroren. Für weitere 24 h wurden sie bei -70°C gelagert, bis man sie zur Langzeitkonservierung in flüssigen Stickstoff übertragen konnte.

Zur Wiederaktivierung wurde die Kryokultur schnell bei 37°C aufgetaut. Um Zellschädigungen durch das DMSO zu verhindern, wurden die Zellen in 5 Volumen DMEM-Komplettmedium resuspendiert und sofort wieder abzentrifugiert (10 min, 250 xg). Nach der Wiederaussaat in einer 10 mm Schale wurde nach dem ersten Anheften (16 h) ein Mediumwechsel zum Entfernen der letzten DMSO-Spuren durchgeführt.

Kryomedium:

DMEM-Komplettmedium mit 20 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid

### 3.6.3 Kultur von Fettzellexplantaten

Fettgewebe wurde aus dem Bauchraum von RS1-knock-out Mäusen bzw. Kontrollmäusen entnommen und in einer 6-Lochplatte (Nunc, Dänemark) bei 37°C kultiviert. Als Nährmedium diente „Dulbecco's modified Eagle's medium“ (DMEM, Sigma, Deisenhofen), das 5 mM Glukose enthielt. In jede Vertiefung wurden 200 mg Fettzellexplantat und 10 ml DMEM gegeben. Nach 16 h wurde das Medium abgezogen, die Zellen einmal mit 10 ml PBS gespült und 5 ml neues DMEM-Medium hinzugegeben. Je nach Versuchsansatz wurde zu einem Teil der Fettexplantate Phloretin in einer Endkonzentration von 100 µM (Fluka, Deisenhofen) oder 1, 7 µM Insulin (>27.5 USP Einheiten pro mg, ICN, Eschwege) zugegeben. Nach 8 h bei 37°C wurden 1 ml Aliquots des Kulturmediums abgenommen und darin die Leptingehalte (3.4.5) bestimmt. Die Proben konnten auch bei -70°C eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

## 3.7 RS1-knock-out Maus

### 3.7.1 Erzeugung und Rückkreuzung der RS1-knock-out Maus

Zur Herstellung einer RS1-knock-out Maus musste zunächst das RS1-Gen aus der Maus und ein RS1-Replacement Vektor kloniert werden (Baumgarten, 1999). Als Vektor wurde ein pPNT3 (Tybulewicz et al., 1991) verwendet, der als positiven Selektionsmarker das Geneticin-Resistenz verleihende Gen der Neomycin-Phosphotransferase und als negativen Marker das Gen der Thymidinkinase enthielt. Das Targetingkonstrukt, pPNT3 3'-5'RS1, linearisiert mit Not I, wurde in embryonale Stammzellen (ES) transfiziert. Die ES stammten von dem braunen Mäusestamm H 129. Auf Agarplatten wurden diese totipotenten Zellen angezogen und die Transfektanten mittels Geneticin selektioniert. Transfizierte embryonale Stammzellen wurden in eine Blastocyste des Mausstammes C57BL/6J (schwarz) mikroinjiziert. Die Blastocyste wurde in eine Leihmutter übertragen. Bei erfolgreicher Injektion konnte nun eine schwarz-braune Chimäre herangezogen werden. Durch Kreuzung der Chimäre mit einer Wildtypmaus (C57BL/6J) konnte eine heterozygote Maus in Bezug auf das RS1-Gen gezüchtet werden. Durch Verkreuzung RS1-heterozygoter Mäuse konnten RS1-homozygote Tiere gezogen werden. Um den genetisch unterschiedlichen Hintergrund zu reduzieren, der durch die Verwendung von H129 Stammzellen und Blastocysten

aus C57BL/6J entstanden ist, wurden die heterozygoten Mäuse über zehn Generationen mit einer Wildtypmaus des Stammes C57BL/6J rückgekreuzt. Man erwartet nach der 5. Generation der Rückkreuzung einen zu 97 % genetisch reinen Background, nach der 10. Generation einen zu 100 % reinen Hintergrund.

Die Klonierung des RS1-Replacementvektors wurde von Dr. Katharina Baumgarten, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg, die Erstellung der RS1-knock-out Maus, sowie die Anzucht der Chimäre vom Labor Prof. Ivan Horak, Institut für Molekulare Pharmakologie, Freie Universität Berlin, übernommen. Zur Rückkreuzung wurden C57BL/6JolaHsd Auszucht-Mäuse von der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln bezogen.

### **3.7.2 Haltung und Verwendung der Mäuse**

Die Mäuse wurden entsprechend den Institutsrichtlinien übereinstimmend mit der deutschen Gesetzgebung untergebracht und betreut. Die Tiere wurden in einem temperaturgeregelten Klima mit einem 12-Stunden-Licht/12-Stunden-Dunkelheit Zyklus gehalten. Gefüttert wurden sie mit einem Altromin Standardfuttermittel (Altromin GmbH, Groß-Lippe, Deutschland). Sie hatten immer Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Entnahme von Blut, Gewichtsermittlung und Entnahme von Gewebeproben nach Genickbruch erfolgten zwischen 10.00 und 11.00 Uhr vormittags. In allen Experimenten hatten die verglichenen Tiere den gleichen genetischen gemischten Hintergrund (H 129 und C57BL/6J) und waren zwischen 4 und 6 Monaten alt. Vergleiche zwischen RS1-knock-out- und Wildtyp-Mäuse wurden immer mit Tieren des gleichen Wurfes aus Rückkreuzung der vierten bis zehnten Generation durchgeführt.

## **3.8 Physiologische Untersuchungen der RS1-knock-out Maus**

### **3.8.1 Gewichtsanalyse**

Das Gewicht von RS1-knock-out Mäusen und entsprechender nicht transgener Kontrolltiere im Alter von etwa 5 Monaten wurde mit der Waage (SAC 64, Scaltec, Göttingen) bestimmt.

### 3.8.2 Analyse des Fressverhaltens

Um zu analysieren, ob RS1-knock-out Mäuse ein anderes Fressverhalten aufwiesen als die Kontrollmäuse wurden zwei unterschiedliche Versuchsansätze gewählt. Einmal wurde den Mäusen kontinuierlich eine definierte Futtermenge zur Verfügung gestellt. Über den Zeitraum von einer Woche wurde der Nahrungsverbrauch alle 24 Stunden kontrolliert. In der zweiten Versuchsanordnung wurde den Tieren über 10 Tage hinweg nur von 9.00 Uhr bis 17.00 Uhr eine definierte Nahrungsmenge (20 g pro Tier) angeboten. Zwischen der achtstündigen Fütterungsperiode, lag eine sechzehnstündige Hungerperiode. Nahrungsverbrauch und Gewicht wurden täglich um 9.00 und um 17.00 Uhr kontrolliert. Beide Versuchsansätze wurden mehrfach mit unterschiedlichen Versuchsgruppen von je 5 Tieren im Alter von etwa 5 Monaten durchgeführt.

### 3.8.3 Aktivitätstest

Um heraus zu finden, ob RS1-knock-out Mäusen und die entsprechenden Kontrollmäuse den gleiche Bewegungsbedarf aufwiesen, wurden eine transgene Maus und parallel eine Wildtypmaus für 24 Stunden in zwei gleiche Käfige mit einem Laufrad gegeben. An dem Laufrad waren durch Dr. Werner Baumgartner, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg, Lichtschranken angebracht worden, so dass Bewegungen in beide Richtungen des Laufrades gezählt werden konnten. Dieser Versuch wurde mit 10 transgenen und parallel dazu mit 10 Wildtyp-Tieren durchgeführt.

### 3.8.4 Oraler Glukosebelastungstest

Ein Glukosetoleranztest an RS1-knock-out Mäusen wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. L. Herberg, Diabetes Forschungsinstitut Universität Düsseldorf durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden fünf männliche und fünf weibliche RS1-knock-out Mäuse im Alter von etwa fünf Monaten und zehn entsprechende Kontrolltiere ausgewählt. Den Tieren wurde das Futter über Nacht entzogen und am nächsten morgen Blut aus der Schwanzspitze entnommen. Das Gewicht und ein basaler Glukosewert der Tiere wurden bestimmt. Per Schlundsonde wurde den Tieren eine 20%ige Glukoselösung (2,5 mg Glukose pro g Körpergewicht, entspricht 12,5 µl/ 1g KPg) verabreicht. 10, 20, 60 und 120 Minuten später wurde Blut aus der Schwanzspitze abgenommen. Zur Analyse der Glukosewerte wurden jeweils 20 µl Vollblut in 1000 µl Hämolysat aufgenommen und mittels eines vollmechanisierten Glukoseanalysators (economic Glukoseanalyser, CARE-diagnostics, Voerde) gemessen. Die Bestimmung der Glukose-

konzentration erfolgte in einer Durchflusszelle mit Hilfe einer membrangebundenen Glukoseoxidase, die eine Umwandlung von  $\beta$ -D-Glukose in D-Gluconolacton und Wasserstoffperoxid katalysierte. Das bei der Reaktion entstandene Wasserstoffperoxid wurde amperometrisch erfasst und diente als Maß für die Glukosekonzentration (Bachg und Reinauer, 1995).

### 3.8.5 Untersuchung der Glukoseabsorption im Darm

Die absorbierte Glukose im Darm wurde als ein Anstieg der portalen Glukosekonzentration während einer *ex vivo* Perfusion des Darms und der Leber gemessen. Die Untersuchungen am perfundiertem Darm von RS1-knock-out Mäusen und Kontrollmäusen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Frank Stümpel, Institut für Biochemie und Molekularer Zellbiologie, Universität Göttingen durchgeführt. Die Präparation wurde im Wesentlichen wie für die Ratte in Stümpel et al., 1996 beschrieben, mit einigen Modifikationen für die Maus, durchgeführt. Die Anästhesie der Mäuse erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion von Pentorbital (20  $\mu$ g/g Körpergewicht). Das Abdomen wurde geöffnet und der Darm vorsichtig auf die Seite gelegt. Die Arteria mesenterica superior wurde von dem umliegenden Gewebe befreit und mit einer Kanüle versehen. Die Vena cava inferior wurde aufgeschnitten und über die Arteria mesenterica superior mit einer nichtrezirkulierende Perfusion von Darm und Leber begonnen (hydrostatischen Druck von 120 cm, einer Flussrate 5 ml/min). Für die Glukoseapplikation wurde ein Plastikkatheder durch den Pylorus in das Lumen des Duodenum eingeführt. Der Blinddarm wurde eingeschnitten und der Darminhalt sehr vorsichtig mit einer warmen Salzlösung ausgespült. Während des Experiments wurde der duodenale Katheter zur Gabe des luminalen Glukose Bolus genutzt. Für die Leberperfusion wurde eine Kanüle durch den rechten Vorhof in die Vena cava inferior eingeführt. Darm und Leber wurden nun vorsichtig frei präpariert und in ein Bad mit warmer organischer Salzlösung transferiert. Zwei flexible kleine Katheder wurden in die Portalvene eingeführt: einer, um Proben für Ermittlungen der Glukosekonzentrationen zu sammeln und den portalen Efflux zu messen, der andere für die Infusion des Insulins. Die Präparation war nach etwa 60 min beendet, nach einer Perfusionsperiode von 20 min mit Krebs-Henseleit Puffer konnte mit den Versuchen begonnen werden. Mittels einer duodenalen Infusion wurde Glukose luminal verabreicht. (1,1 mmol D-Glukose in 0,25 ml 0,9 % NaCl-Lösung pro Minute). Danach wurden jede Minute Proben aus der Portalvene entnommen. Zum Zeitpunkt null wurde die basale Glukoseabsorption gemessen, nach 6 min wurde der erste Glukose Bolus mit einer Konzentration von 100 mg Glukose in 100  $\mu$ l 0,9 % NaCl-Lösung gegeben. Nach 26 min wurde ein

weiterer Glukose Bolus gemeinsam mit einer Insulingabe (100 nM) in die Pfortader gesetzt. Nach weiteren 20 min wurde ein dritter Glukose Bolus verabreicht, gleichzeitig wurde cyclisches AMP (10  $\mu$ M) in die Arteria mesenterica superior gegeben. Die Glukose wurde mit einem Standard-Enzym-Test mit Hilfe einer Glukosedehydrogenase (Banauch et al., 1975) und photometrischer Messung bestimmt. Der Anstieg der Glukosekonzentration in der Pfortader reflektierte direkt die absorptive Funktion des Dünndarms. Die Intaktheit der Präparation wurde während aller Experimente überprüft. Diese Untersuchungen wurden an fünf Kontrolltieren und fünf RS1-knock-out Tieren im Alter zwischen drei und sechs Monaten durchgeführt.

Perfusionsmedium: Krebs-Henseleit Puffer

5 mM Glukose, 2 mM Lactat, 0,2 mM Pyruvat, 1 mM Glutamin, 3 % Dextran, 1 % BSA, äquilibriert mit einer Gasmischung aus O<sub>2</sub>/ CO<sub>2</sub> (19:1)

## 3.9 Mikroskopie

### 3.9.1 Lichtmikroskopie und Fotografie

Lichtmikroskopie erfolgte über das Axiophot 2 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena). Nicht fluoreszierende Präparate wie Fettzellpräparate wurden ohne Zuschalten der Halogenlampe betrachtet. Die Fluoreszenzmikroskopie der mit cy3gekoppelten Sekundäntikörper behandelten Präparate erfolgte unter Einsatz des Fluoreszenzfilters Nummer 15 bei einem Exzitationsmaximum von 546 nm, bei cy2gekoppelten Zweitantikörpern mit dem Fluoreszenzfilter Nummer 9 bei einem Exzitationsspektrum von 250 bis 490 nm. Mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbte Kern-DNA konnte unter Verwendung des Filters Nummer 25, Exzitationsmaxima bei 400, 495, und 570 nm, betrachtet werden. Fotografiert wurde mit einer Axiophot 2 Kamera in der Fluoreszenzmikroskopie auf Kodak T-max 400 Filmen, ansonsten auf Agfa APX 25.

### 3.9.2 Konfokales Laserscan

Zur genaueren Bestimmung der Lokalisation des Fluoreszenzsignals wurden Präparate auch mit Hilfe eines konfokalen Laserscanmikroskops untersucht. Es wurde mit einem Zeiss LSM 510 Laserscangeräte an einem Zeiss Axiovert 100 am Institut für molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg unter Mithilfe von Hilde Merkert

gearbeitet. Die Anregung des DAPI-Farbstoffes erfolgte bei 364 nm mittels eines UV-Lasers. Indocarbocyanin wurde mittels eines Helium-Neonlasers bei 543 nm angeregt, Carbocyanin mittels eines Argon-Lasers bei 488 nm.

### **3.10 Statistische Analyse**

Die Ergebnisse wurden in Mittelwerten  $\pm$  SE (Standardfehler) ausgedrückt, sofern nicht anders angegeben. Teilweise wurden auch Standardabweichungen verwendet, diese wurden gegebenenfalls mit SD angegeben.  $n$  repräsentiert die Anzahl der untersuchten Proben oder Tiere. Vergleiche wurden mit einem ungepaarten t-Test gemacht, wenn  $p$  kleiner als 0,05 war, wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant angegeben.

## 4. Ergebnisse

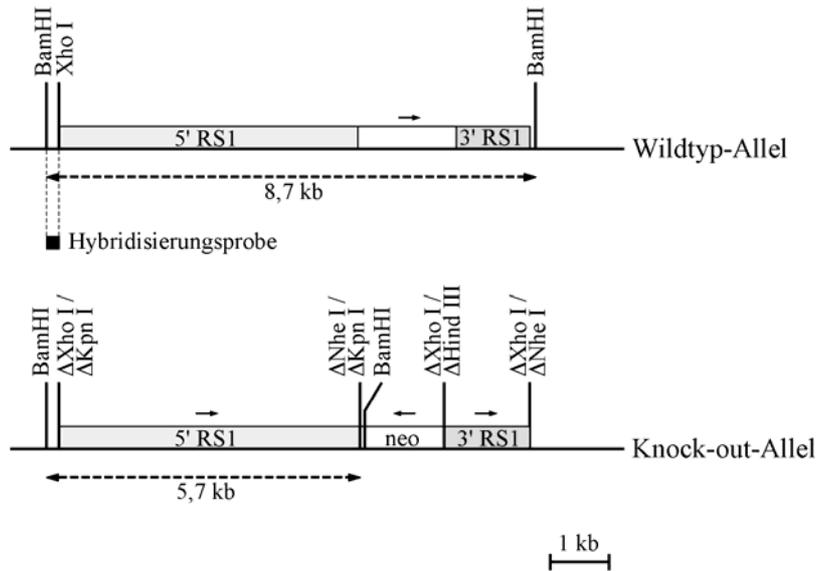
Das Targetingkonstrukt zur Erstellung der RS1-knock-out Maus wurde von Dr. Katharina Baumgarten, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg kloniert. Die Erstellung der RS1-knock-out Maus wurde von Dr. Klaus-Peter Knobloch, Institut für Molekulare Pharmazie, Berlin übernommen. Zu Beginn der Arbeit war die Maus, die es zu charakterisieren galt, bereits vorhanden. Einige Nachweisverfahren für die Abwesenheit des RS1-Gens und anfängliche RNA-Analysen mittels Northern-Blot waren bereits vor Beginn dieser Arbeit schon durchgeführt worden. Sie sind in dieser Arbeit zum Teil nochmals aufgeführt, da sie in der Arbeit von Dr. Katharina Baumgarten noch nicht statistisch abgesichert waren und verifiziert werden sollten.

### 4.1 Nachweisverfahren des knock-out-Ereignisses

#### 4.1.1 Genomische Southern-Blot Hybridisierung

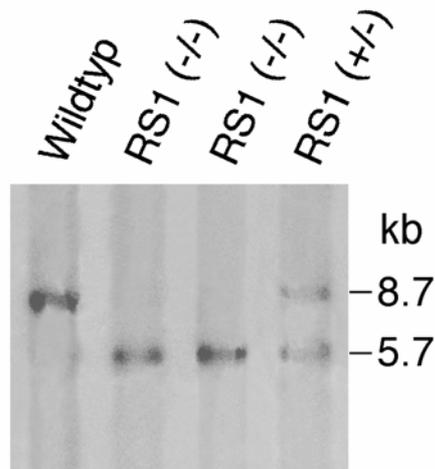
Zum Nachweis einer erfolgreichen homologen Rekombination und der Abwesenheit des RS1-Gens in der RS1-knock-out Maus war ein genomisches Southern-Blot Verfahren notwendig. Abbildung 4-1 zeigt das Prinzip der RS1-Typisierung mittels genomischem Southern. Es musste eine Sonde gewählt werden, die bei der Hybridisierung des transgenen Allels eine andere Größe aufwies als bei der Hybridisierung des Wildtyp-Allels. Zur Southern-Hybridisierung wurde ein an den 5'-Homologiebereich grenzendes, 200 bp großes Fragment gewählt, das durch einen BamHI/XhoI-Verdau erhältlich war. Bei einer Restriktion der genomischen DNA mit BamHI erhielt man beim RS1-Wildtyp-Allel ein 8,7 kb großes Fragment. Im knock-out-Allel lag nach homologer Rekombination eine BamHI-Schnittstelle vor der Neomycin-kassette, so dass nach Verdau ein 5,7 kb großes Fragment entstand.

Abbildung 4-2 zeigt einen genomischen Southern-Blot mit Maus-Nachkommen aus einer Heterozyotenverpaarung. Für das Wildtyp-Allel ergab die genomische Southern Hybridisierung ein Signal bei 8,7 kb, bei erfolgreicher Rekombination hatten Heterozygote neben der Wildtypbande auch ein Signal bei 5,7 kb, homozygote RS1-knock-out Tiere zeigten nur eine Bande bei 5,7 kb. Von Dr. Klaus-Peter Knobloch, Molekulare Pharmakologie, Freie Universität Berlin, wurden mehrere Southern-Hybridisierungen durchgeführt. Nach diesen Ergebnissen (Abb. 4-2) war die homologe Rekombination und damit die Erzeugung der RS1-knock-out Maus erfolgreich.



**Abb. 4-1 Strategie der genomischen Southern Hybridisierung**

Bei Verwendung der BamHI/XhoI-Hybridisierungsprobe führte ein BamHI-Verdau der genomischen DNA im Wildtyp-Allel zur Detektion eines 8,7 kb großen Fragments, im knock-out-Allel aufgrund einer zusätzlichen Schnittstelle zu einem 5,7 kb großen Fragment.

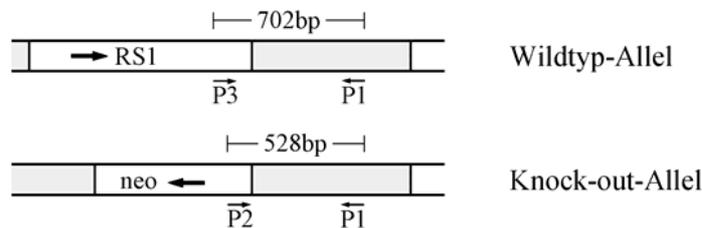


**Abb. 4-2 Genomischer Southern-Blot zur Analyse des Genotyps**

Genomische DNA wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und mit der BamHI/XhoI Hybridisierungsprobe inkubiert. Gezeigt sind eine Wildtypmaus Bande bei 8,7 kb, zwei RS1-knock-out Mäuse (RS1 (-/-)), Bande bei 5,7 kb, und eine heterozygote Maus (RS1 (+/-)) mit beiden Banden. Nachweis der erfolgreichen homologen Rekombination wurden von Dr. Klaus-Peter Knobeloch, Molekulare Pharmakologie, Freie Universität Berlin, durchgeführt.

### 4.1.2 Genomische PCR

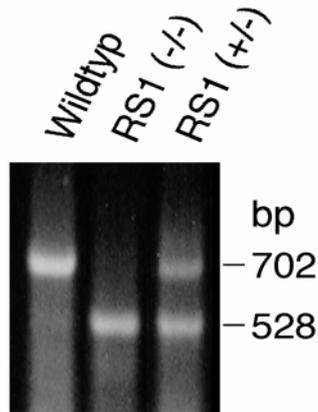
Als weiterer Nachweis des fehlenden RS1 Gens und zur leichteren Typisierung von zahlreichen Maus-Nachkommen, wurde eine PCR genomischer DNA durchgeführt. Um unspezifische Reaktionen zu vermeiden, wurden relativ lange, aus 20 Nukleotiden bestehende, Oligonukleotidprimer eingesetzt, mit denen unter stringenten Annealing Bedingungen von 60°C gearbeitet werden konnte. Ein Primer P1 wurde im nicht-codierenden 3' Bereich gewählt, der sowohl im Wildtyp-Allel als auch im RS1-knock-out-Allel vorhanden war. Ein zweiter Primer P2 wurde im Bereich der Neomycinkassette gewählt, so dass er gemeinsam mit P1 zum Nachweis des RS1-knock-out-Allels diente. Ein dritter Primer P3 wurde im codierenden Bereich des RS1-Gens ausgesucht, um in Kombination mit P1 das Wildtyp-Allel nachzuweisen. Die Primer wurden so gewählt, dass Wildtyp- und Transgene-Amplifikate unterschiedliche Größe aufwiesen. Die DNA der Wildtypmäuse lieferte eine Bande bei 702 bp, die DNA der RS1-knock-out Mäuse eine Bande bei 528 bp, heterozygote Mäuse zeigten beide Banden. Diese PCR wurde von Dr. Katharina Baumgarten entwickelt und von mir modifiziert.



**Abb. 4-3 Strategie der genomischen PCR**

Bei Verwendung des Primers P1 (mRS15), der auch im 3' Homologiebereich des RS1-pPNT-Replacementkonstrukts vorhanden war, und des Primers P2 (pPNT3) konnte das RS1-knock-out-Allel nachgewiesen werden. Während mit P1 und P3 (mRS16), der aus dem offenen Leserahmen von mRS1 stammt, das Wildtyp-Allel gezeigt werden konnte.

In Abbildung 4-4 sind die PCR-Amplificate einer homozygoten Wildtypmaus, einer heterozygoten Maus und einer homozygoten RS1-knock-out Maus gezeigt. Es wurde ein PCR-Ansatz gewählt, in dem alle drei Primer enthalten waren. Nach der PCR wurden die Nukleinsäuren mittels einer Elektrophorese im TAE-Gel aufgetrennt. Auch die genomische PCR zeigte ein erfolgreiches Ausschalten des RS1-Gens und einen geglückten Einbau der Neomycinkassette bei der RS1-knock-out Maus.

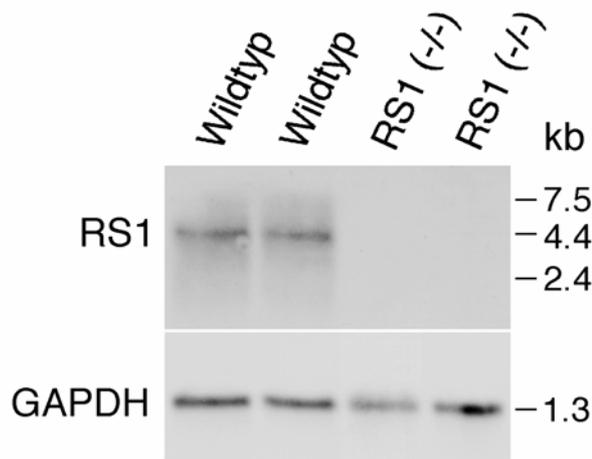


**Abb. 4-4 Genomische PCR zur Typisierung von Mäusen**

Die genomische DNA wurde mittels Proteinase K-Verdau isoliert und eine PCR mit nachfolgender Elektrophorese durchgeführt. Wildtypmäuse zeigten ausschließlich eine Bande bei 702 bp, RS1-knock-out Tiere (RS1 (-/-)) bei 528 bp. Bei heterozygoten Mäusen (RS1 (+/-)) konnten beide Banden amplifiziert werden.

**4.1.3 Northern-Blot Hybridisierung**

Den Nachweis, dass RS1 auch auf Transkriptionsebene ausgeschaltet ist, lieferte ein Northern-Blot mit einer cDNA-Sonde gegen das Maus-RS1. Dazu wurden mRNAs aus den Nieren von zwei Wildtyp- und zwei RS1-knock-out-Tieren verwendet. Abbildung 4-5 zeigt, dass nur in den Wildtypmäusen die mRS1-RNA auf der Höhe von 4,4 kb detektiert werden konnte, in den RS1-knock-out Mäusen jedoch kein Hybridisierungssignal auftrat.

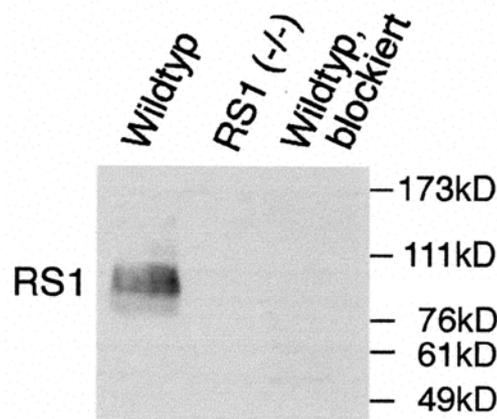


**Abb. 4-5 Nachweis von mRS1-RNA im Northern-Blot**

Für den Northern-Blot wurden je Spur 5 µg mRNA, isoliert aus Mäusenieren, im BES-Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und hybridisiert. Als mRS1-cDNA-Sonde wurde ein Fragment, das die Nukleotide 934-1234 (# Y11917) umfasste, eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Beladungskontrolle mit einer h-GAPDH-Sonde, Nukleotide 256-866 (# J02642) durchgeführt.

#### 4.1.4 Western-Blot Detektion

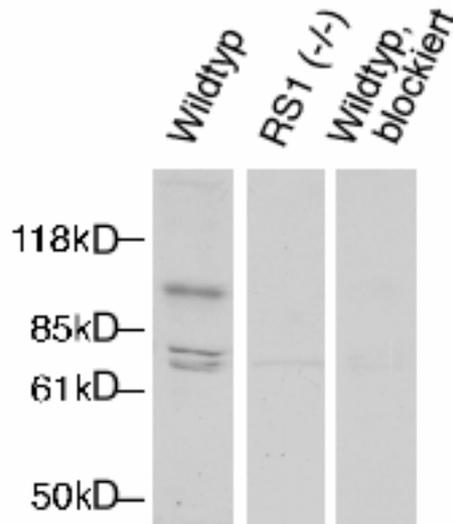
Um die Abwesenheit des RS1-Proteins bei den RS1-knock-out Mäusen zu zeigen, wurde mit Gesamtmembranen des Darms eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und eine anschließende Western-Blot Detektion durchgeführt. Zum Nachweis des RS1-Proteins wurde eigens ein neuer Antikörper gegen die Aminosäuresequenz 436 - 454 (GLSPDREDVRRSTESARKS-C) im Kaninchen erzeugt (3.4.1.1). In den Proteinproben konnte nur im Darm der Wildtypmäuse mittels des selbsterzeugten, affinitätsgereinigten, polyklonalen Peptidantikörpers das mRS1-Protein nachgewiesen werden. Die Reaktion war spezifisch, denn die Detektion der mRS1-Bande bei 100 kD konnte durch Präabsorption des Antikörpers mit dem antigenen Peptid blockiert werden.



**Abb. 4-6a Nachweis des mRS1-Proteins im Darm mittels Western-Blot**

*Die Fraktionen der angereicherten Plasmamembranen wurden in Laemmli-Puffer denaturiert und in der SDS-PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde für den Nachweis des mRS1-Proteins das affinitätsgereinigte anti-mRS Serum 77/II (Fraktion 6, Titer 1: 1200) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Das Signal konnte nur bei der Wildtypmaus detektiert werden. Bei der RS1(-/-)-Maus und bei Inkubation mit präabsorbiertem Antikörper wurde keine Bande detektiert.*

Auch an präparierten Bürstensaummembranen der Niere konnte nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot Detektion mit dem Peptidantikörper gegen mRS1 das RS1-Protein nur bei Wildtypmäuse nachgewiesen werden (Abb. 4-6b). Auch hier konnte die Reaktion durch Präabsorption des Antikörpers mit dem Peptid blockiert werden.



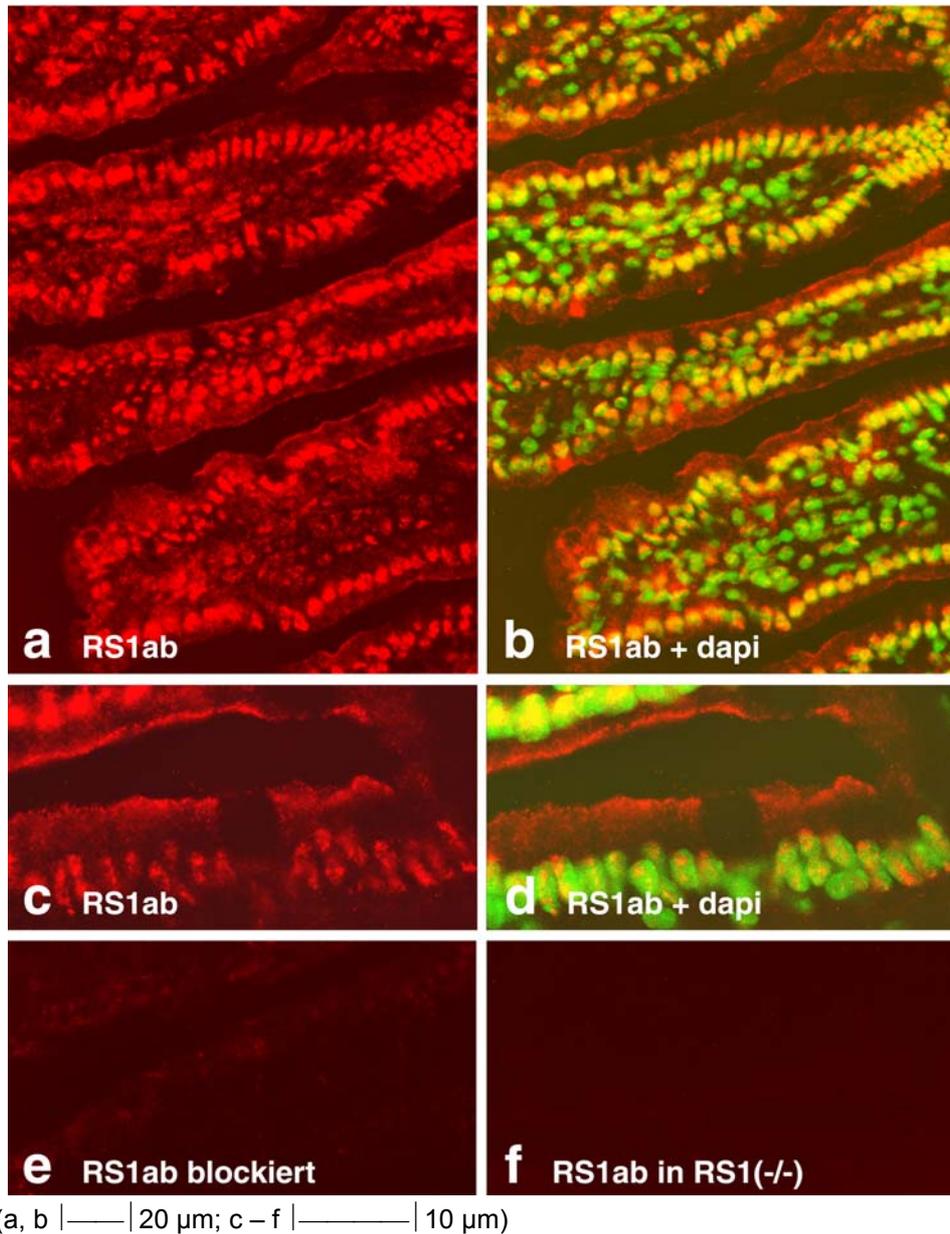
**Abb. 4-6b Nachweis des mRS1-Proteins in der Niere mittels Western-Blot**

Je 20 µg Protein der angereicherten Bürstensaummembranen wurden pro Bande aufgetragen. Nach Trennung in der SDS-PAA-Gelelektrophorese und dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde mit dem affinitätsgereinigte anti-mRS Serum 77/II (Fraktion 6, Titer 1: 1200) in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert. Das Signal konnte nur bei der Wildtypmaus, nicht aber bei der RS1-knock-out Maus detektiert werden. Bei Präabsorption des Antikörpers war keine Bande nachweisbar.

## 4.2 Verteilung des RS1-Proteins im Dünndarm der Wildtypmaus

### Immunhistologischer Nachweis von mRS1 am Dünndarm

Um die Verteilung des RS1-Proteins im Dünndarm zu zeigen, wurde an Gewebeschnitten der Wildtypmaus eine immunhistologische Markierung durchgeführt. Die RS1-knock-out Maus konnten als Negativkontrolle verwendet werden. Das Jejunum der Mäuse wurde nach der Entnahme gespült, aufgerollt und in Isopentan schockgefroren. Auf diese Weise ließen sich gut bei -20°C Objektträgertemperatur und -24°C Kammertemperatur 5 µm dicke Schnitte am Kryotom erstellen. Zum Nachweis des Maus-RS1-Proteins wurde der neue, selbsthergestellte Antikörper gegen die Aminosäuresequenz 436 - 454 (GLSPDREDVRRSTESARKS-C) des mRS1 eingesetzt. Nach der Fixierung wurde dieser affinitätsgereinigten Peptidantikörper genutzt, um die Lokalisation des RS1-Proteins festzustellen. In den Präparaten der Wildtypmäuse (Bild 4-7 a und c) zeigte sich im Bereich der Bürstensaummembran in epithelialen und subepithelialen Zellen sowie in den Zellkernen eine starke Fluoreszenz. Die Kernlokalisierung konnte hier das erste Mal am Gewebe gezeigt werden, bisher war sie nur von LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen bekannt (Akimjanova et al., 2003).



**Abb. 4-7 Immunhistologische Verteilung von RS1 am Dünndarm der Wildtypmaus**

Reaktion des affinitätsgereinigten anti-mRS1-Antikörper (77/II, Sulfolinkaufreinigung, Fraktion 7, Titer 1: 1100) an paraformaldehydfixiertem Dünndarmgewebe der Maus. Der primäre Antikörper wurde jeweils in einer Verdünnung von 1:50 verwendet. Bild a und c zeigen einen repräsentativen Schnitt durch jejunale Zotten einer Wildtypmaus in zwei verschiedenen Vergrößerungen (a und b — 20 µm; c bis f — 10 µm). Die rote Fluoreszenz des Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers ist an der Membran und in den Kernen zu sehen. In Bild b und d ist zusätzlich die entsprechende DAPI-Anfärbung der Kerne abgebildet. Zu Verdeutlichung der Kernlokalisierung wurde die ursprünglich blaue Kernanfärbung in grün umgewandelt. Bei Überlagerung der Signale erscheinen die Kerne nun gelb. Bild e zeigt das Ergebnis der Präabsorption. In Abbildung f ist die Reaktion des mRS1-Antikörpers mit Dünndarmgewebe der RS1-knock-out Maus unter gleichen Bedingungen zu sehen.

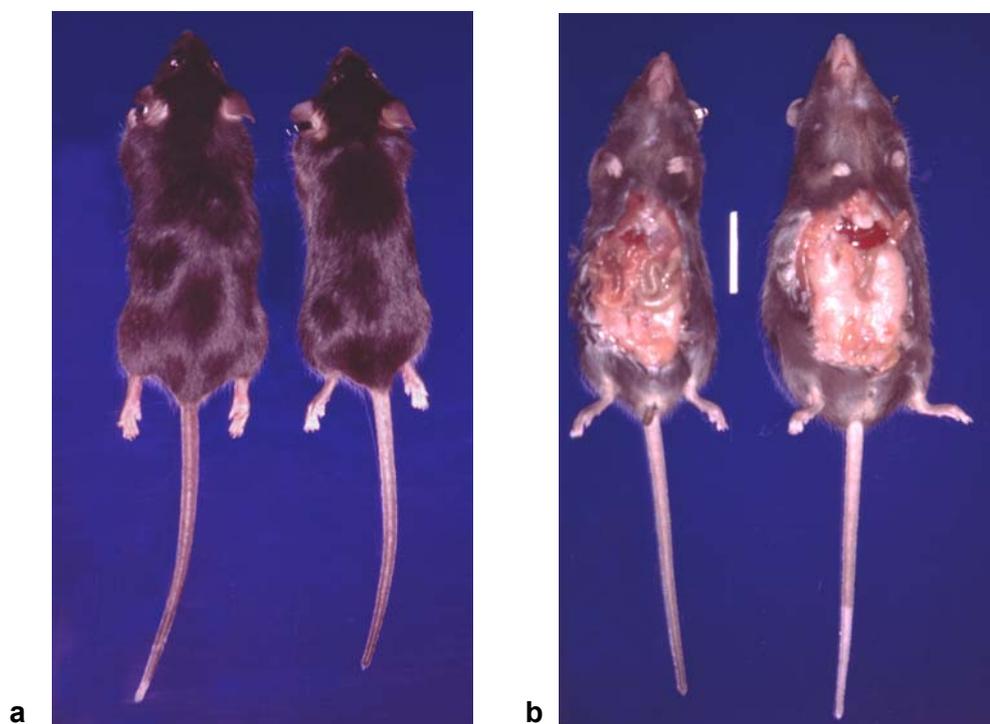
Bei den Gewebeproben der RS1-knock-out Mäuse war die Reaktion im Bereich der Bürstensaummembran und in den Zellkernen nicht zu erkennen (Abb. 4-7 f). Die Kernlokalisierung des RS1 wurde bei den Wildtypmäusen durch gleichzeitiges Anfär-

ben mit dem mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI überprüft (Bild 4-7 b und d). Die Lage der Fluoreszenzreaktion, verursacht durch den mRS1-Peptidantikörper, und der DAPI-Anfärbung stimmten überein. Die Reaktion des mRS1-Antikörpers war spezifisch, da sich das Reaktionsmuster nach Präabsorption des Antikörpers mit dem antigenen Peptid auch bei den Wildtypmäusen nicht mehr darstellen ließ (Abb. 4-7 e). Die verwendeten Tiere stammten aus der achten Rückkreuzungsgeneration.

### 4.3 Untersuchungen zum Phänotyp der RS1-knock-out Mäuse

#### 4.3.1 Beschreibung des Phänotyps

Analysen von heterozygot miteinander verpaarten Mäusen zeigten eine Verteilung der drei Genotypen entsprechend den Mendelschen Regeln. Es konnten 211 heterozygote Mäuse, 87 Wildtypmäuse und 95 RS1-knock-out Mäuse gezählt werden. Das weist darauf hin, dass es keine verminderte embryonale Entwicklungsfähigkeit bei den RS1-knock-out Tieren beziehungsweise den heterozygoten Tieren gibt.



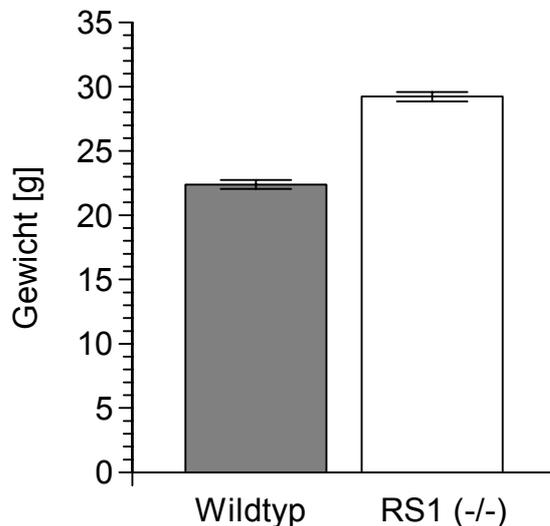
**Abb. 4-9** Fotografie einer RS1-knock-out Maus und einer Wildtypmaus

Die männlichen Tiere wurden im Alter von fünf Monaten aus einem Wurf nach der achten Rückkreuzung entnommen und nach Genickbruch fotografiert. In Bild a ist links eine RS1-knock-out Maus zu sehen und rechts eine Wildtypmaus. In Bild b ist nach Eröffnung des Bauchraums rechts die RS1-knock-out Maus zu sehen und links die Wildtypmaus.

Die RS1-knock-out Mäuse sind postnatal lebensfähig, fruchtbar und vermehren sich gut. In dieser Arbeit konnte herausgefunden werden, dass die RS1-knock-out Mäuse im Vergleich zu den Wildtyptieren etwas größer und dicker sind (Abb. 4-9 a). Gleichzeitig weisen sie mehr Fettgewebe im Bauchraum auf (Abb. 4-9 b). Diese Fettsucht tritt erst ab einem Alter von etwa vier Monaten auf.

#### 4.3.2 Gewichtsbestimmung

Ein Vergleich zwischen RS1-knock-out Mäusen und Kontrollmäusen zeigte, dass RS1-knock-out Tiere im Alter von fünf Monaten ein bis zu 30 % erhöhtes Körpergewicht besitzen. Zur Gewichtsanalyse wurden RS1-knock-out Mäuse und Wildtypmäuse im Alter von fünf Monaten gewogen. Für die weiblichen RS1-knock-out Tiere wurde ein Durchschnittsgewicht von  $29,3 \pm 0,4$  g bestimmt, für die entsprechenden Wildtyptiere von  $22,4 \pm 0,3$  g (Abb. 4-10). Der Unterschied war in hohem Grade signifikant ( $p < 0,0001$ ,  $n = 30$ ). Ähnliche Gewichtsunterschiede waren bei Wägungen der männlichen Tieren zu ermitteln (Wildtypmäuse  $32,3 \pm 0,9$  g, RS1-knock-out Mäuse  $38,2 \pm 0,6$  g,  $p < 0,01$ ,  $n = 10$ ) (Daten nicht gezeigt). Die Gewichtsanalysen wurden in mehreren Rückkreuzungsgenerationen (Rückkreuzung fünf bis zehn) zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt.



**Abb. 4-10 Gewichtsbestimmung**

Weibliche RS1-knock-out Mäuse und Wildtypmäuse im Alter von 4-6 Monaten wurden gewogen. Bei  $n = 30$  ergab sich eine Signifikanz von  $p < 0,0001$ . Die Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  SE.

### 4.3.3 Analyse der Körperzusammensetzung

Aufgrund des erhöhten Körpergewichts der RS1-knock-out Mäuse wurde eine Körperzusammensetzungsanalyse durchgeführt. Weibliche Mäuse, fünf Monate alt, wurden lebend gewogen, nach Genickbruch getrocknet und mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch extrahiert (3.5.3). Durch Gewichtsbestimmung nach jedem Arbeitsschritt konnten unterschiedliche Parameter wie Wassergehalt des Körpers und Gesamtfettgehalt bestimmt werden (Tabelle 4-1).

	Körpergewicht, lebend [g]	Körperwasser [g]	Körpergewicht, getrocknet [g]	Fett [g]	Körpergewicht, Fett extrahiert [g]
Wildtyp	24,6 ± 0,7	16,7 ± 0,7	7,9 ± 0,2	1,5 ± 0,1	6,4 ± 0,2
RS1(-/-)	30,8 ± 1,5 **	20,3 ± 1,7 *	10,5 ± 0,7 **	2,7 ± 0,5 *	7,8 ± 0,9 *

**Tab. 4-1 Körperzusammensetzungsanalyse**

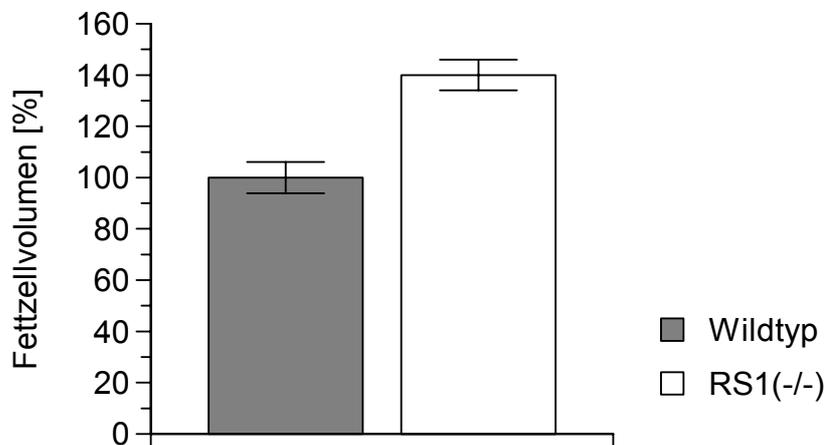
*Es wurden Lebend- und Trockengewichte bestimmt. Aus deren Differenzen konnte das Körperwasser kalkuliert werden. Die getrockneten Mäuse wurden einzeln in Chloroform:Methanol (3:1) extrahiert und der Fettgehalt wurde bestimmt. Die Angaben sind Mittelwerte ± SE, n = 5, \*p<0,05, \*\*p<0,001*

Die Ergebnisse der Gewichtsbestimmung aus 4.3.2 wurden bestätigt, bei n = 5 war das Lebendkörpergewicht der weiblichen RS1-knock-out Mäuse um  $25 \pm 7$  % ( $p<0,01$ ) erhöht. Die RS1-knock-out Mäuse wiesen daneben auch einen um  $22 \pm 3$  % erhöhten Wassergehalt ( $p<0,05$ ), einen um  $80 \pm 34$  % erhöhten Fettgehalt ( $p<0,05$ ) und eine um  $22 \pm 13$  % erhöhte getrocknete, fettfreie Körpermasse ( $p<0,05$ ) auf. Die bei weitem größte relative Änderung wurde beim Fettgehalt beobachtet, jedoch tragen Änderungen des Wassergehalts und der getrockneten, fettextrahierten Körpermasse ebenfalls zu der Steigerung des Gesamtkörpergewichts bei.

### 4.3.4 Untersuchung der Fettzellgröße

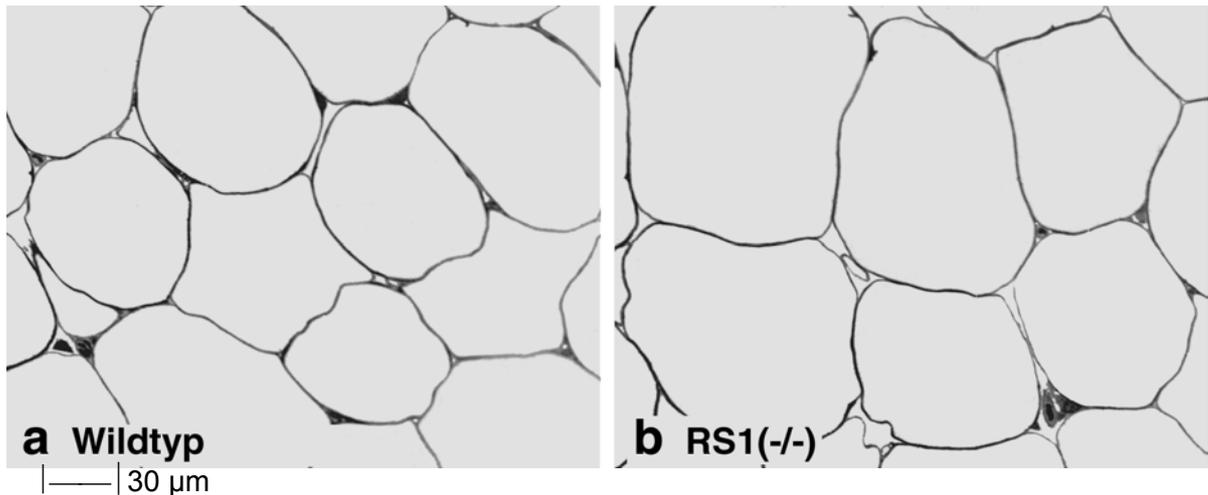
Um zu analysieren, ob der erhöhte Fettgehalt der RS1-knock-out Tiere auf eine Fettzellvermehrung (Hyperplasie) oder eine Fettzellvergrößerung (Hypertrophie) zurückzuführen ist, wurde die Größe der Fettzellen bestimmt. Aus je drei weiblichen

RS1-knock-out Mäusen beziehungsweise Kontrollmäusen wurde abdominales Fettgewebe entnommen. Dieses Fettgewebe wurde in ein Eponharz eingebettet. Mit dem Kryotom wurden Semidünnschnitte erzeugt und unter dem Mikroskop fotografiert (3.5.2). Einbettung und Gewebeschnitte wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Georg Krohne, Zoologie, Universität Würzburg durchgeführt. Die Fotos wurden statistisch ausgewertet, indem man die Schnittpunkte der Fettzellränder mit einem aufgelegten Rasterfeld zählte. Je 10 Felder mit 405 bis 480 Zellen wurden ausgezählt. Die Daten ergaben, dass die Flächen der Fettzellen bei den RS1-knock-out Mäusen um  $25 \pm 3,3$  % größer waren als bei den Wildtypmäuern. Für einen Vergleich der Fettzellvolumina zwischen RS1-knock-out Mäusen und Wildtypmäusen wurden die relativen Abschnittsbereiche umgewandelt, wobei man eine idealisierte Kugelform der Fettzellen annahm (3.5.2). Das relative Fettzellvolumen der RS1(-/-)-Mäuse war um  $40 \pm 6$  % größer verglichen mit dem der Wildtypmäuse ( $p < 0,01$ ) (Abb. 4-11). Die Daten weisen darauf hin, dass die Zunahme des Körperfetts der RS1-knock-out Mäuse zum Teil durch eine Vergrößerung der Fettzellen bedingt ist. In Abbildung 4-12 sind zwei repräsentative Fotos gezeigt. Die Untersuchungen wurden an Tieren, die aus der siebten Rückkreuzungsgeneration stammten, durchgeführt.



**Abb. 4-11 Fettzellgrößenbestimmung**

Aus RS1-knock-out Mäusen bzw. Kontrollmäusen wurde abdominales Fettgewebe entnommen. Das in Eponharz eingebettete Fettgewebe wurde semidünn geschnitten, unter dem Mikroskop fotografiert und statistisch ausgewertet. Das relative Fettzellvolumen der Wildtypmäuse wurde auf 100 % gesetzt. ( $n = 405-480$ ,  $p < 0,01$ ).



**Abb. 4-12 Fotografie der Fettzellen**

*Fettgewebe aus dem Bauchraum wurde entwässert und in Epon 812 bei 60°C eingebettet. Nach der Polymerisation konnten Semidünnschnitte (0,5 µm) erzeugt werden, die auf Objektträger aufgebracht und mit Epon eingedeckelt wurden. Unter dem Lichtmikroskop wurden Fotos gemacht. Auf Bild a sind repräsentative Fettzellen einer Wildtypmaus abgebildet, auf Bild b Fettzellen einer RS1-knock-out Maus.*

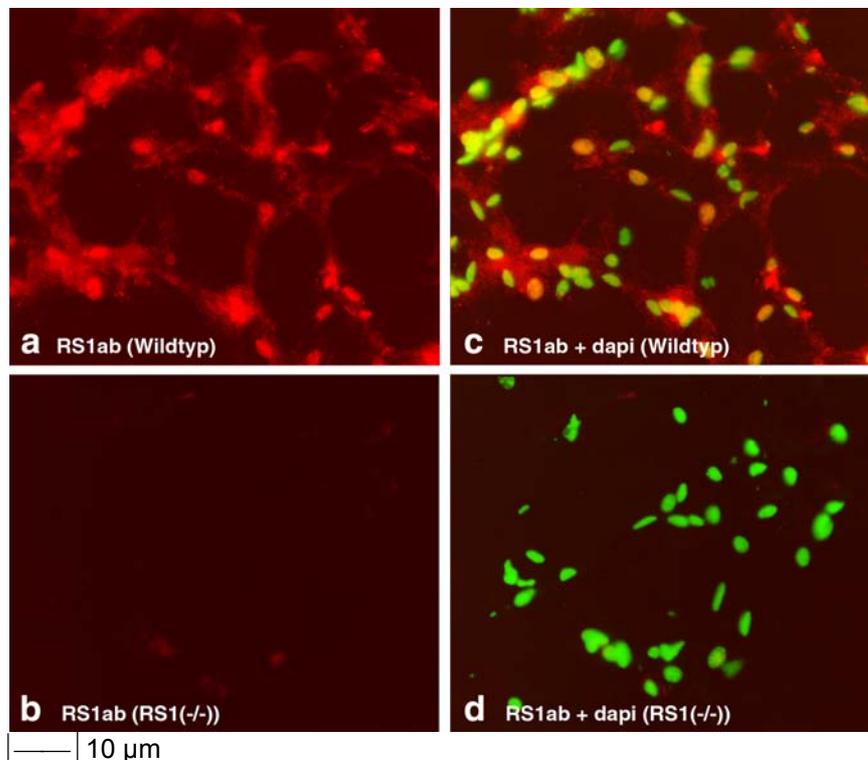
#### 4.3.5 Immunhistologischer Nachweis von mRS1 am Fettgewebe

Um herauszufinden, ob die Zunahme des Körperfetts der RS1-knock-out Mäuse direkt durch den Einfluss von RS1 bedingt sein könnte, wurde mittels Immunfluoreszenz untersucht, ob das mRS1-Protein bei Wildtypmäusen im Fettgewebe exprimiert wird. Die RS1-knock-out Mäuse konnten als Negativkontrolle verwendet werden. Fettgewebe aus Wildtyp- und RS1-knock-out Mäusen der achten Rückkreuzungsgeneration wurde nach der Entnahme in Isopentan schockgefroren und am Kryotom bei -28°C Objektträgertemperatur und -30°C Kammertemperatur geschnitten. Nach der Fixierung mit Paraformaldehyd wurden die Gewebeschnitte mit dem neuen, selbsthergestellten, affinitätsgereinigten Peptidantikörper gegen mRS1 inkubiert. Zur besseren Orientierung wurden die Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt (Bild 4-8c und d). In den Präparaten der Wildtypmäuse (Bild 4-8a) zeigte sich eine Fluoreszenz des Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers in den Zellkernen und in epithelialen und subepithelialen Geweben. Die Qualität der Kryoschnitte lässt allerdings keine ausführliche subzelluläre Lokalisation zu. An den Fettzellen der RS1-knock-out Mäuse war mit dem Peptidantikörper gegen Maus-RS1 keine Reaktion zu erkennen (Abb. 4-8b).

Auch am Fettgewebe ist eine Doppellokalisierung von RS1 an der Plasmamembran und innerhalb des Kernes zu erkennen. Diese Verteilung stimmt mit der Lokalisation

am Dünndarm der Maus und mit der Lokalisation des Schweine-RS1 in der renalen Nierenzelllinie LLC-PK1 überein (Kühlkamp, 2001).

Bei RS1-knock-out Mäusen wäre nach diesen Ergebnissen ein direkter Einfluss auf die Fettzellen beim Fehlen von RS1 denkbar.



**Abb. 4-8 Immunhistologische Verteilung von RS1- Protein am Fettgewebe**

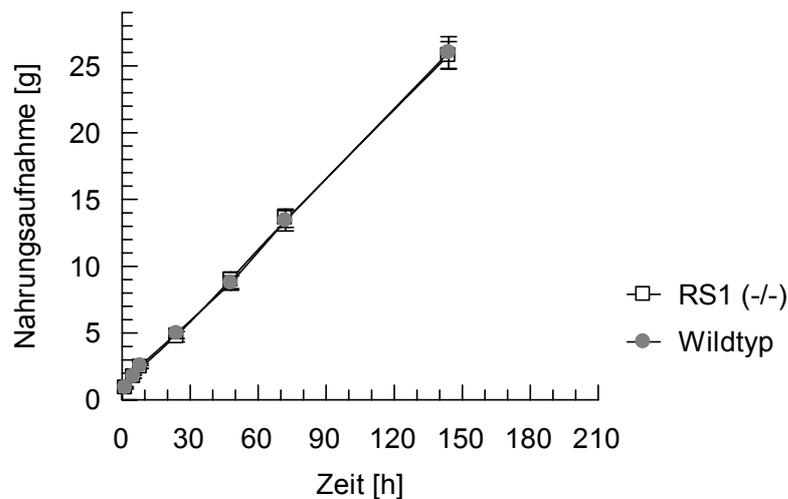
Lokalisation des RS1-Proteins in paraformaldehydfixiertem Fettgewebe der Wildtypmaus. Bild a zeigt einen repräsentativen Schnitt durch Fettgewebe einer Wildtypmaus inkubiert mit dem anti-mRS1-Antikörper (77/II, Sulfolinkaufreinigung, Fraktion 7, Titer 1: 1100) in der Verdünnung 1:50. In Abbildung b ist die Reaktion des mRS1-Antikörpers mit Fettgewebe aus der RS1-knock-out Maus unter gleichen Bedingungen dargestellt. Bild c und d zeigen die entsprechenden Schnitte mit DAPI-Anfärbung der Kerne (in grün umgewandelt).

## 4.4 Physiologische Untersuchungen

### 4.4.1 Analysen des Fressverhaltens

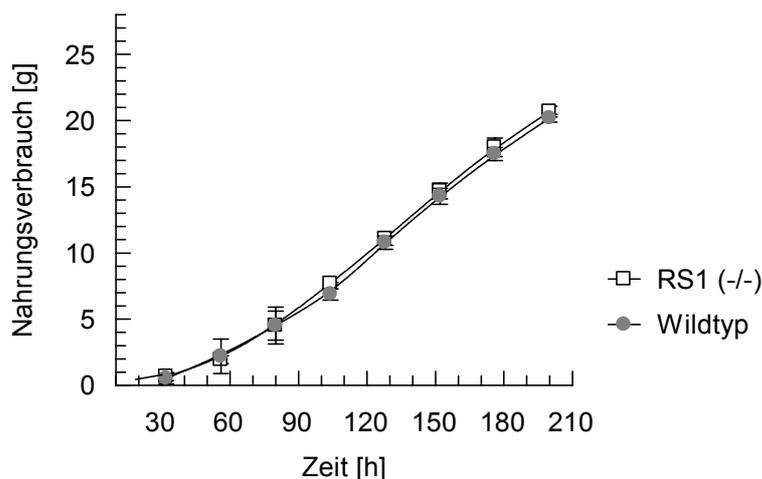
Um aufzuklären, ob die bei den RS1-knock-out Mäusen beobachtete Adipositas auf eine gesteigerte Nahrungsaufnahme zurückzuführen ist, wurde das Fressverhalten der Tiere in zwei verschiedenen Versuchsreihen über eine Periode von sieben oder neun Tagen beobachtet (3.8.2). Während der Versuche hatten die Mäuse freien Zugang zu Wasser. RS1-knock-out- und Wildtyp-Gruppen aus je fünf weiblichen und fünf männlichen Mäusen wurden miteinander verglichen. In der einen Versuchs-

ordnung wurde den Tieren kontinuierlich Altromin Standardlabornahrung *ad libitum* zur Verfügung gestellt. In dem zweiten Experiment hatten die Mäuse tagsüber nur acht Stunden lang Zugang zu Futter (Altromin Standardlabornahrung) und wurden über Nacht einem Futterentzug ausgesetzt. Die zweite Versuchsanordnung, die nicht den physiologischen Bedingungen entsprach, wurde gewählt um die Adaptationsfähigkeit der Mäuse zu ermitteln. In Abbildung 4-13 a und b ist der beobachtete Futterverbrauch von RS1-knock-out- und Wildtypmäußen gegen die Zeit dargestellt. Unter beiden Bedingungen zeigten RS1-knock-out Mäuse und Wildtypmäuse vergleichbare Nahrungsaufnahme.



**Abb. 4-13a Futterverbrauch**

Bei permanentem Futterangebot *ad libitum* wurde der Futterverbrauch bei RS- knock-out Mäusen und Wildtypmäusen bestimmt ( $n = 10$ ). Die Mäuse stammten aus gleichen Würfen. Wasser wurde unbegrenzt angeboten. Die Gerade wurde durch lineare Regression ermittelt.



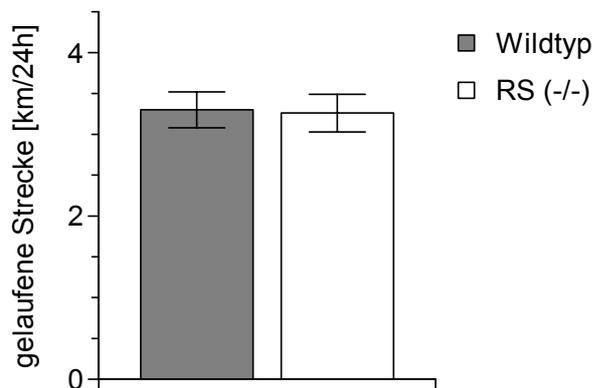
**Abb. 4-13b Futterverbrauch nach regelmäßigem Nahrungsentzug**

Nach Futterentzug über Nacht und darauf folgendem 8-stündigem Futterangebot wurde bei RS1-knock-out Mäusen und Wildtypmäusen die Nahrungsaufnahme bestimmt ( $n = 10$ ). Wasser wurde unbegrenzt angeboten. Für RS1-knock-out Mäuse wurden nahezu identische Steigungen wie für die Wildtypmäuse beobachtet. Die Steigungen in Abb. 4-13b waren signifikant kleiner als die in Abb. 4-13a.

Bei permanentem Futterangebot wiesen sowohl die RS1-knock-out Mäuse als auch die Wildtypmäuse einen Nahrungsverbrauch von  $4,4 \pm 0,5$  g /24 h auf (Abb. 4-13a). Bei regelmäßigem Futterentzug über Nacht benötigten die Mäuse drei Tage um sich an das Nahrungsangebot tagsüber anzupassen. Danach zeigten sie eine signifikant reduzierte Nahrungsaufnahme im Vergleich zu den Tieren, die uneingeschränktes Futterangebot zur Verfügung hatten ( $p < 0,01$ ). Auch hier waren keine signifikanten Unterschiede im Fressverhalten zwischen RS1-knock-out Mäusen und Wildtypmäusen zu finden (Abb. 4-13b). Die bei den RS1-knock-out Mäusen beobachtete Adipositas kann demnach nicht auf eine gesteigerte Nahrungsaufnahme zurückgeführt werden.

#### 4.4.2 Aktivitätstest

Mit Hilfe eines Aktivitätstests sollte geprüft werden, ob die bemerkte Adipositas bei Fehlen des RS1-Proteins auf reduzierte motorische Aktivität zurückzuführen ist. Um den Bewegungsbedarf zu überprüfen, wurden je eine transgene Maus und parallel eine Wildtypmaus für 24 Stunden in zwei gleiche Käfige mit einem Laufrad gesetzt. Das Laufrad war mit einem Zähler versehen worden, der Bewegungen in beide Richtungen des Laufrades registrierte. Dieser Versuch wurde mit je zehn transgenen und zehn Wildtyptieren aus der zehnten Rückkreuzungsgeneration durchgeführt. Zwischen den beiden Tiergruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied ermitteln. Wie in Abbildung 4-14 zu sehen, liefen RS1-knock-out Mäuse innerhalb von 24 Stunden  $9048 \pm 633$  Umdrehungen, Wildtypmäuse  $9154 \pm 618$ . Eine Umdrehung entspricht 36 cm. So haben RS1-knock-out Mäuse in einer Periode von 24 Stunden eine Strecke von  $3,26 \pm 0,23$  km, Wildtypmäuse eine Strecke von  $3,30 \pm 0,22$  km in dem Laufrad zurückgelegt.



#### Abb. 4-14 Aktivitätstest

RS1-knock-out Mäuse und Wildtypmäuse wurden für 24 Stunden in zwei gleiche Käfige mit einem Laufrad gesetzt. Die Umdrehungen wurden mit Hilfe eines Laufrades gezählt, die gelaufene Strecke errechnet und statistisch ausgewertet ( $n = 10$ ). Die Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  SE.

## 4.5 Untersuchung von D-Glukose und Lipiden im Blutserum

Da die beobachtete Adipositas bei RS1-knock-out Mäusen auch zu Stoffwechselveränderungen führen könnte, wurden D-Glukose-Konzentrationen und einige Parameter des Fettstoffwechsels im Blut untersucht. Für diese Analysen wurden Blutseren von elf Wildtypmäuse und elf RS1-knock-out Mäusen verwendet. Die Blutproben wurden morgens von Tieren, die Futter *ad libitum* (Altromin Standardlabornahrung) zur Verfügung hatten, entnommen. Die Untersuchungen wurden im Labor von Frau Dr. Biemer-Daub, Aventis Pharma, Frankfurt durchgeführt. Glukose, Triglyceride, Cholesterin, HDL-Cholesterin und LDL-Cholesterin wurden mit käuflichen Kits der Firma Roche, Mannheim analysiert. Freie Fettsäuren mittels eines Kits der Firma Wako, Neuss und Glycerin- und Hydroxybutyrat-Werte durch Kits der Firma Randox, Crumlin, UK. Bei der Durchführung wurden die Angaben des jeweiligen Herstellers befolgt und die entsprechenden Extinktionswerte der enzymatischen Testsysteme mit dem Gerät Hetaschi 912 gemessen. Bei den Testsystemen ist darauf hinzuweisen, dass sie auf das humane System validiert sind und dadurch bei den Wildtypmäusen Abweichungen von den in der Literatur bekannten Werten entstehen können. Abgesehen vom Cholesterin war bei den restlichen untersuchten Parametern kein signifikanter Unterschied zwischen RS1-knock-out und Wildtyp zu sehen. Die Serum-Cholesterin-Konzentrationen waren bei der RS1-knock-out Mäuse ( $3,0 \pm 0,2$  mM) signifikant erhöht im Vergleich zu den Wildtypmäusen ( $2,3 \pm 0,2$  mM) ( $p < 0,05$ ).

	D- Glukose [mM]	Triglyceride [mM]	Cholesterin [mM]	HDL [mM]	LDL [mM]	FFA [mM]	Glycerin [mM]
Wildtyp	10,7 ± 0,5	1,3 ± 0,1	2,3 ± 0,2	1,8 ± 0,2	0,25 ± 0,02	0,82 ± 0,05	0,39 ± 0,02
RS1(-/-)	10,4 ± 0,6	1,3 ± 0,1	3,0 ± 0,2	2,1 ± 0,1	0,27 ± 0,03	0,89 ± 0,06	0,36 ± 0,03

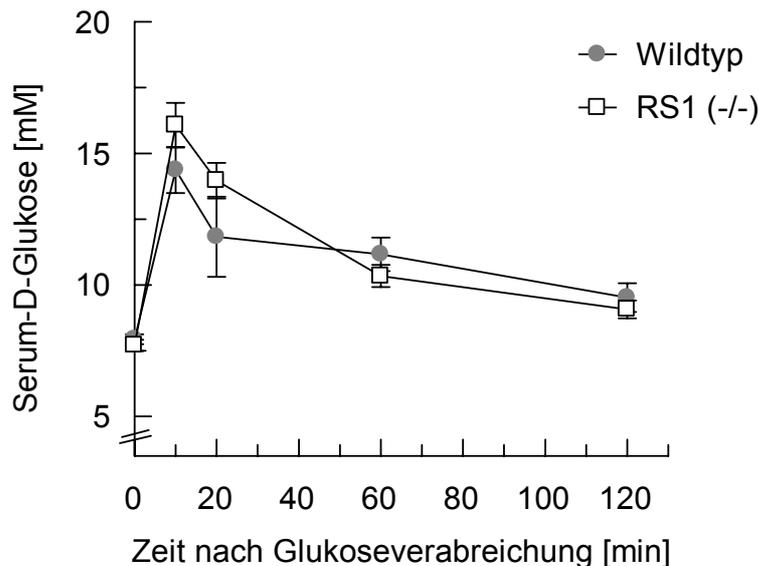
**Tab. 4-2 Blutanalyse**

*Die Blutproben von RS1-knock-out- und Kontrollmäuse wurden von ad libitum gefütterten Tieren entnommen, abzentrifugiert und sofort bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zum Nachweis der verschiedenen Parameter wurden handelsübliche Kits verwendet ( $n=11$ ). Verwendet wurden Tiere der siebten Rückkreuzungsgeneration. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SE.*

## 4.6 Regulation der Glukosekonzentration im Blutserum und Reabsorption der Glukose im Darm

### 4.6.1 Orale Glukosebelastungstest

In vorangegangenen *in vitro* Experimenten wurde gezeigt, dass RS1 an der Regulation des Na<sup>+</sup>-abhängigen D-Glukosetransporters SGLT1 beteiligt ist (Veyhl et al., 1993, Lambotte et al., 1996). Um festzustellen, ob RS1 die insulinabhängige Regulation der Glukosekonzentration im Blut beeinflusst, wurde die postprandiale Regulation der D-Glukose im Blutserum untersucht. Zehn RS1-knock-out Mäuse und Wildtypmäuse (fünf Monate alt), die über Nacht einem Futterentzug ausgesetzt waren, wurden einem Glukosetoleranztest unterzogen. Zunächst wurde ein basaler Blutzuckerwert gemessen, dann 10, 20, 60 und 120 Minuten nach der oralen Glukosegabe (2,5 mg je g Körpergewicht) Blut abgenommen und der Blutzuckerspiegel im Vollblut bestimmt.



**Abb. 4-15 Blutzuckerkonzentration nach oraler Glukosegabe**

Nicht anästhesierten RS1-knock-out Mäusen und Wildtypmäusen aus der sechsten Rückkreuzungsgeneration wurde 2,5 mg D-Glukose pro g Körpergewicht oral verabreicht und nach 10, 20, 60 und 120 min der Blutzuckerspiegel bestimmt ( $n = 10$ ;  $p = 0,18-0,50$ ).

Wildtypmäuse und transgene Mäuse zeigten einen vergleichbaren basalen Blutzuckerwert ( $7,9 \pm 0,2$  mM bzw.  $7,7 \pm 0,2$  mM). In Abbildung 4-14 ist zu sehen, dass sich nach Glukosegabe kein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen erkennen ließ, die RS1-knock-out Tiere jedoch nach 10 und 20 min leicht erhöhte Werte zeigten. Bei den RS1-knock-out Mäusen stiegen die Blutglukosewerte nach 10 Minuten um  $103 \pm 11$  %, bei den Wildtypmäusen um  $87 \pm 12$  %. Auch wenn der Unter-

schied bezüglich der Glukosewerte nicht signifikant war, besteht die Möglichkeit, dass D-Glukose im Darm der RS1-knock-out Mäuse vermehrt reabsorbiert wird. Diese erhöhten Werte sind aber im Blutserum durch die Glukoseaufnahme in die Leber nicht nachweisbar.

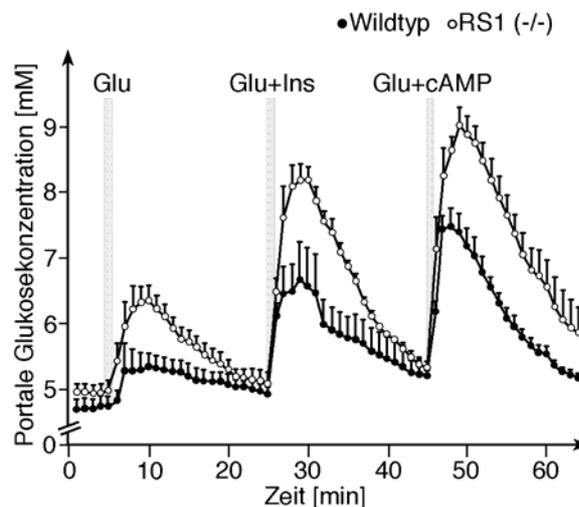
Bei RS1(-/-)-Mäusen und Wildtypmäusen waren vergleichbare Herunterregulationen des postprandialen D-Glukoseanstiegs im Blut zu beobachten. Das weist darauf hin, dass die Insulinausschüttung des Pankreas und die schnelle Blutzuckerregulation mittels Insulin bei den RS1-knock-out Tieren nicht gestört ist. Ein Nachteil bei diesen Untersuchungen bestand darin, dass die Tiere durch die orale Glukosegabe mittels einer Schlundsonde unter ziemlichem Stress standen und durch Ausschüttung von Adrenalin starke Schwankungen des Blutzuckerspiegels entstehen können, die in den relativ großen Standardfehlern zum Ausdruck kommen. Außerdem können bei Messungen der Glukosekonzentration im systemischen Blut Schwankungen der Glukosekonzentrationen in der Pfortader übersehen werden. Deshalb wurde die Glukoseabsorption im Darm in einer *ex vivo* Präparation untersucht.

#### 4.6.2 Glukoseabsorption im Darm

Die intestinale Reabsorption von D-Glukose wurde als ein Anstieg der portalen Glukosekonzentration während einer *ex vivo* Perfusion des Darms und der Leber gemessen (3.8.5). Da die intestinalen Venen in der Portalvene gesammelt werden, kann aus dem Anstieg der Glukosekonzentration nach Glukoseapplikation im Darm und aus der Flussrate der Pfortader die intestinale Resorption von Glukose bestimmt werden. Sauerstoff, Lactat, Pyruvat, Glutamin und 5 mM D-Glukose wurden durch nicht rezirkulierende Perfusion des Dünndarms und der Leber über den Truncus coeliacus und die Arteria mesenterica superior verabreicht. Dabei wurde der venöse Abfluss durch Eröffnung der Vena Cava inferior geschaffen. Die Glukoseabsorption des gesamten Dünndarms wurde ermittelt, nachdem ein Bolus von 100 mg D-Glukose in 0,25 ml Salzlösung verabreicht wurde (Abb. 4-16a). Die portale Glukosekonzentration stieg bei den Wildtypmäusen von einem basalen Wert von  $4,8 \pm 0,1$  mM bis zu einem Peak von  $5,3 \pm 0,1$  mM, bei den RS1-knock-out Mäusen von  $5,0 \pm 0,1$  mM bis zu einem Peak von  $6,4 \pm 0,3$  mM an (Abb. 4-16a). Aus dem Anstieg der Glukosekonzentration im portalen Efflux und dem Volumen des Efflux wurde die gesamte Menge der absorbierten D-Glukose kalkuliert (Abb. 4-16b). Bei den RS1-knock-out Mäusen war die Glukoseabsorption im Darm signifikant erhöht.

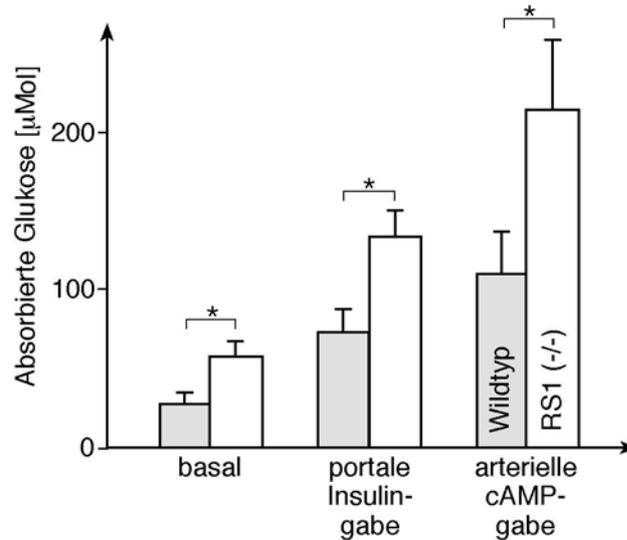
In früheren Experimenten an der Ratte konnte gezeigt werden, dass eine Applikation von Insulin in die Portalvene zu einer gesteigerten Glukoseabsorption führt (Stümpel

et al., 1996). Nach Interpretation der Autoren wird diese Hochregulation durch Anregung der adrenergen Nerven vermittelt. Das in die Portalvene verabreichte Insulin kommt mit dem Dünndarm nicht in Kontakt. Stümpel et al. (1998) konnten zeigen, dass die intestinale Glukoseabsorption auch durch Infusion von cAMP in die Arteria mesenterica superior stimuliert werden konnte. Weil die gesteigerte Zuckerabsorption durch Insulin und cAMP nur bei Monosacchariden beobachtet wurde, die vom SGLT1 transportiert werden, wurde die erhöhte Absorption einer Aktivierung des Na<sup>+</sup>-D-Glukosekotrporter SGLT1 zugeschrieben. Abbildung 4-16a zeigt, dass die Stimulation der intestinalen D-Glukoseabsorption durch Insulin und cAMP auch bei Mäusen zu beobachten war. Sowohl unter basalen als auch unter stimulierenden Bedingungen war die Absorption von D-Glukose im Dünndarm der RS1-knock-out Mäuse signifikant höher als die der Wildtypmäuse. Die Gesamtmenge der absorbierten D-Glukose war bei den transgene Mäusen um 117 ± 43 % (basal), 94 ± 13 % (Insulin) oder 91 ± 53 % (cAMP) im Vergleich zu den Wildtypmäusen erhöht (p<0,05). Nach Anregung mit cAMP wurden 37 % der verabreichten D-Glukose im Darm absorbiert. Die Daten zeigen, dass bei den RS1(-/-) Mäusen die Aktivität des Na<sup>+</sup>-D-Glukosekotrporters gesteigert ist, wobei die Hochregulation der Glukoseabsorption durch Insulin oder cAMP nicht beeinflusst ist.



**Abb. 4-16a Glukoseabsorption im Darm**

Basale, insulinstimulierte und c-AMP-stimulierte Glukoseabsorption des isolierten und perfundierten Darms und der Leber von RS1-knock-out Mäusen und Wildtypmäusen (n = 5-6). Die Versuche wurden mit Tieren aus der sechsten Rückkreuzungsgeneration gemacht. Darm und Leber wurden mit einem Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer über die Arteria mesenterica superior perfundiert. Glukose wurde intraluminal nach 6, 26 und 46 min verabreicht. Die Glukoseabsorption zeigte sich im Anstieg der portalen Glukosekonzentration. Von Minute 24 bis 30 wurde Insulin in die Pfortader gegeben, von Minute 44 bis 50 wurde cAMP in die Arteria mesenterica superior infundiert.



**Abb. 4-16b Absorbierte Glukosemenge im Darm**

Absorbierte Gesamtglukosemenge, berechnet aus der portalen Glukosekonzentration und dem Volumen des Efflux. Darm und Leber von RS1-knock-out Mäusen und Wildtypmäusen wurden wie oben beschrieben perfundiert. Glukose wurde intraluminal, Insulin in die Pfortader und cAMP arteriell verabreicht. Die Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  SE ( $p < 0,01$ ;  $n = 5-6$ ).

Die Untersuchungen am perfundiertem Darm von RS1-knock-out Mäusen und Kontrollmäusen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Frank Stümpel, Institut für Biochemie und Molekularer Zellbiologie, Universität Göttingen durchgeführt.

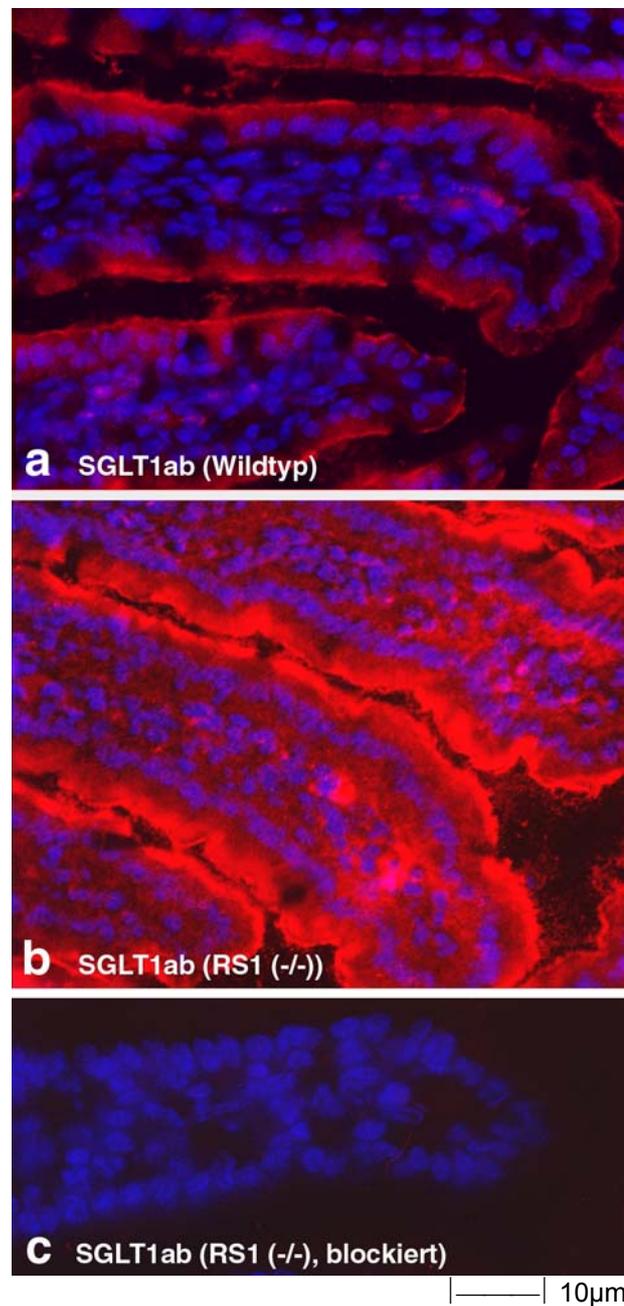
## 4.7 Expression des SGLT1 und GLUT2 am Dünndarm

Als nächstes wurde untersucht, ob die Erhöhung der Glukoseaufnahme bei RS1-knock-out Mäusen auf einer vermehrten Expression der beteiligten Transporter beruht. Bei der Resorption im Dünndarm wird D-Glukose zunächst durch den luminalen  $\text{Na}^+$ -D-Glukosekotrporter SGLT1 in die Darmepithelzellen aufgenommen und gelangt dann mit Hilfe des basolateral lokalisierten Transporters GLUT2 in das Interstitium und ins Blut.

### 4.7.1 Immunhistologische Verteilung des SGLT1 am Darm

Die Verteilung des  $\text{Na}^+$ -abhängigen D-Glukosekotrporters im Darm wurde bei Wildtypmäusen und RS1-knock-out Mäusen untersucht. Das Jejunum wurde nach Genickbruch entnommen, gespült, aufgerollt, in Isopentan schockgefroren und bei  $-70^\circ\text{C}$  gelagert. An einem Kryotom wurden bei  $-20^\circ\text{C}$  Objektträgertemperatur und  $-24^\circ\text{C}$  Kammertemperatur  $5 \mu\text{m}$  dicke Gefrierschnitte erstellt. Die Immunreaktion wurde direkt anschließend mit einem affinitätsgereinigten Antikörper, der gegen ein

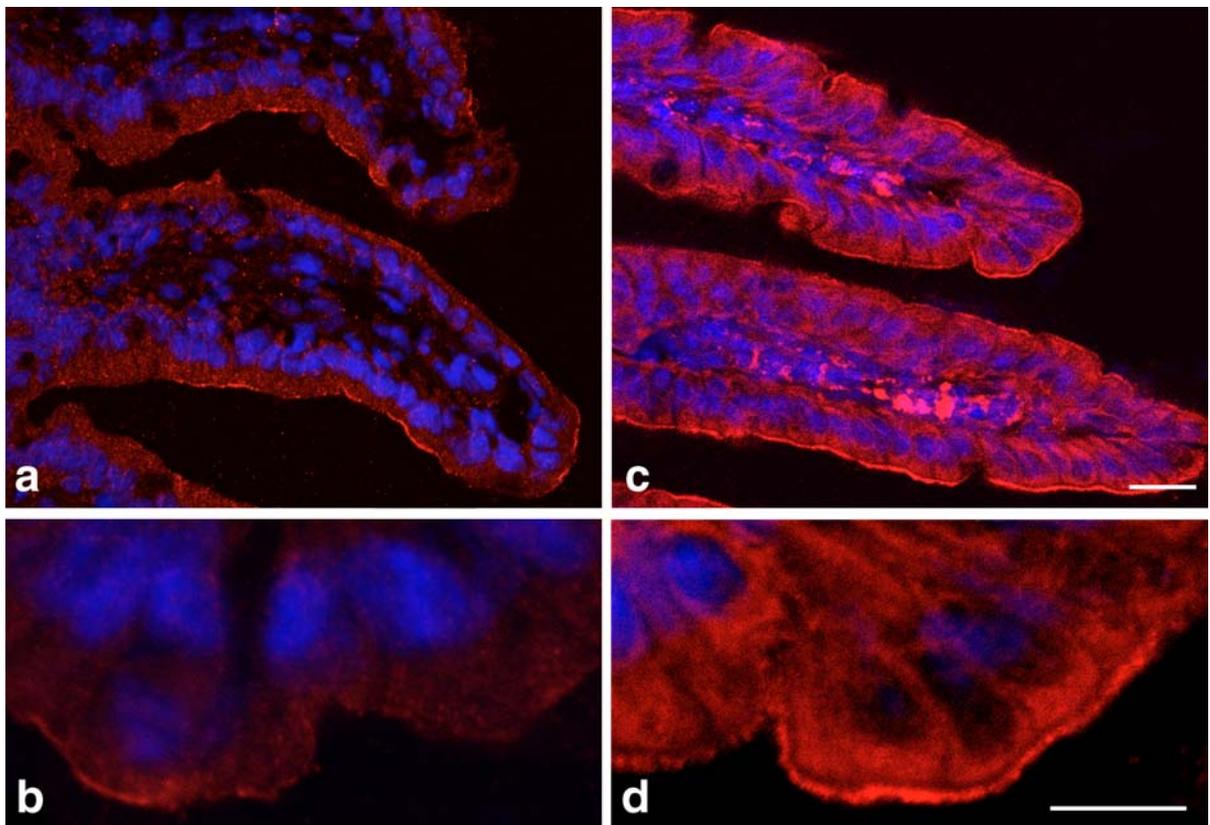
subtypenspezifisches Peptid von SGLT1 (Aminosäuren 586 bis 601, KDTIEIDTEAPQKKKG-C) erzeugt worden ist, durchgeführt. Zur genaueren Lokalisation wurden die Kerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt.



**Abb. 4-17 Immunhistologische Verteilung von mSGLT1 am Dünndarm**

Reaktion des affinitätsgereinigten anti-mSGLT1-Antikörpers (187/V, Sulfolinkreinigung, Fraktion 7, Titer 1:800, Verdünnung 1:200) an paraformaldehydfixiertem Dünndarmgewebe der Maus. Bild a zeigt einen repräsentativen Schnitt durch jejunale Zotten einer Wildtypmaus, Bild b einen Schnitt durch jejunale Zotten einer RS1-knock-out Maus. Das Signal des Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers ist an der Membran zu sehen. Bei den Schnitten der RS1-knock-out Maus ist die Fluoreszenz wesentlich stärker. In Abbildung c ist die Reaktion mit dem präabsorbierten Antikörper bei einer RS1-knock-out Maus gezeigt. Gleichzeitig ist in allen drei Abbildungen die DAPI-Anfärbung der Kerne dargestellt. Die Mäuse stammten aus der neunten Rückkreuzungsgeneration.

In den Abbildungen 4-17a und b zeigten sich deutliche Signale an der Bürstensaummembran der Enterozyten. Bei den Gewebeschnitten der RS1-knock-out Mäusen war die Immunreaktion verglichen mit der der Wildtypmäusen wesentlich stärker. In Bild 4-17c ist die Blockierung der Antikörperreaktion mit dem antigenen Peptid an einem Darmschnitt einer RS1-knock-out Maus dargestellt. Die Fluoreszenzreaktion des mSGLT1-Antikörpers im luminalen Bereich der Enterozyten deutete an, dass neben der luminalen Membran auch subepitheliale Vesikel markiert waren. Zur genaueren Lokalisation des SGLT1 Signals wurden die Schnitte mit dem konfokalen Laserscannmikroskop betrachtet (Abb. 4-18). Die Laserscannuntersuchungen zeigten, dass SGLT1 sowohl an als auch unter der Bürstensaummembrane lokalisiert ist. Bei den RS1(-/-) Mäusen war die Menge an SGLT1 in beiden Bereichen erhöht.

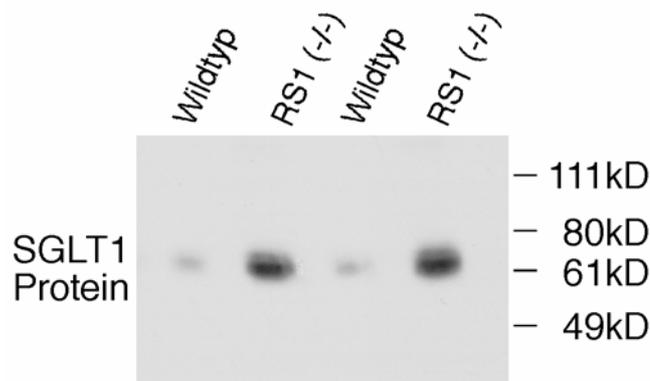


**Abb. 4-18 Aufnahmen am konfokalen Laserscan der Verteilung von mSGLT1**

Reaktion des affinitätsgereinigten anti-mSGLT1-Antikörpers (187/V) an paraformaldehydfixiertem Dünndarmgewebe der Maus mit dem konfokalen Laserscannmikroskop betrachtet. Bild a und b zeigen einen repräsentativen Schnitt durch jejunale Zotten einer Wildtypmaus in zwei verschiedenen Vergrößerungen. Bild c und d bilden einen repräsentativen Schnitt durch jejunale Zotten einer RS1-knock-out Maus ebenfalls in zwei verschiedenen Vergrößerungen ab (a und c — 20  $\mu\text{m}$ ; b und d — 10  $\mu\text{m}$ ). Das Signal des mSGLT1 ist bei der RS1-knock-out Maus an und unter der Membran zu sehen.

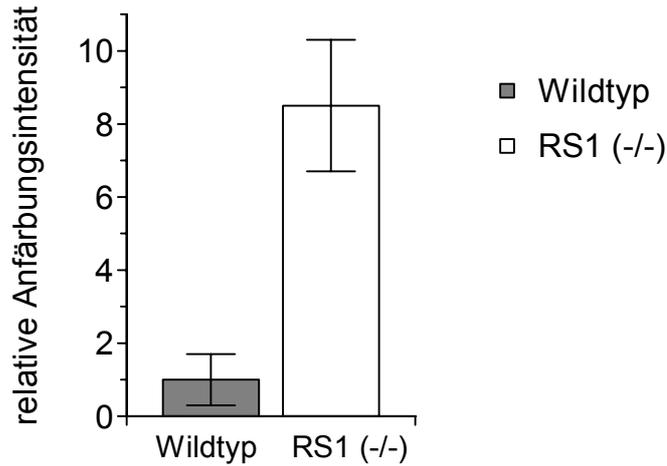
#### 4.7.2 Quantifizierung der SGLT1-Proteinexpression am Darm

Um die Zunahme von SGLT1 quantitativ zu bestimmen, wurden mit angereicherten Plasmamembranfraktionen des Darms Western-Blot Analysen durchgeführt. Nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und dem Transfer auf eine Membran wurden die Proteinfraktionen mit dem Maus-SGLT1 Antikörper (187/V) inkubiert. Bei den RS1-knock-out Mäusen konnte in den Proteinproben des Darms mit dem selbst-erzeugten, polyklonalen Peptidantikörper eine größere Menge des Na<sup>+</sup>-abhängigen D-Glukosetransporters nachgewiesen werden (Bild 4-19a). Die Detektion der mSGLT1-Bande zwischen 60 und 70 kD konnte durch Präabsorption des Antikörpers mit dem antigenen Peptid blockiert werden (Daten nicht gezeigt). Zur quantitativen Bestimmung der Proteinmenge wurde die Anfärbungsintensität der Banden auf den Röntgenfilmen von zwei Western-Blots ausgewertet. Diese densitometrische Quantifizierung von sechs Reaktionen aus zwei unabhängigen Experimenten deckte eine siebenfach höhere Menge SGLT1-Protein in RS1-knock-out Mäusen auf ( $p < 0,001$ ). In Abbildung 4-19b ist die statistische Auswertung der erstellten Western-Blots mit dem mSGLT1-Antikörper dargestellt.



**Abb. 4-19a Expression des SGLT1-Proteins im Darm**

Angereicherten Plasmamembranen aus dem Dünndarm von Wildtyp- und RS1-knock-out Mäusen wurden in Laemmli-Puffer denaturiert und je 2,5 µg in der SDS-PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde mSGLT1 im Western-Blot mit dem affinitätsgereinigtem mSGLT1-Antikörper nachgewiesen (Serum 187/V, Sulfolinkreinigung, Fraktion 7, Verdünnung 1:200). Bei den RS1-knock-out Mäusen konnte ein stärkeres Signal detektiert werden.

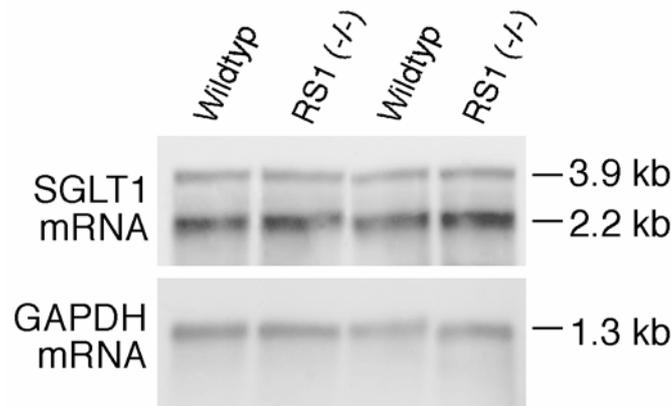


**Abb. 4-19b Densitometrische Quantifizierung der Western Blots**

Von sechs Reaktionen aus zwei unabhängigen Versuchen wurden die Intensität der Banden auf den Röntgenfilmen quantifiziert ( $p < 0,001$ ).

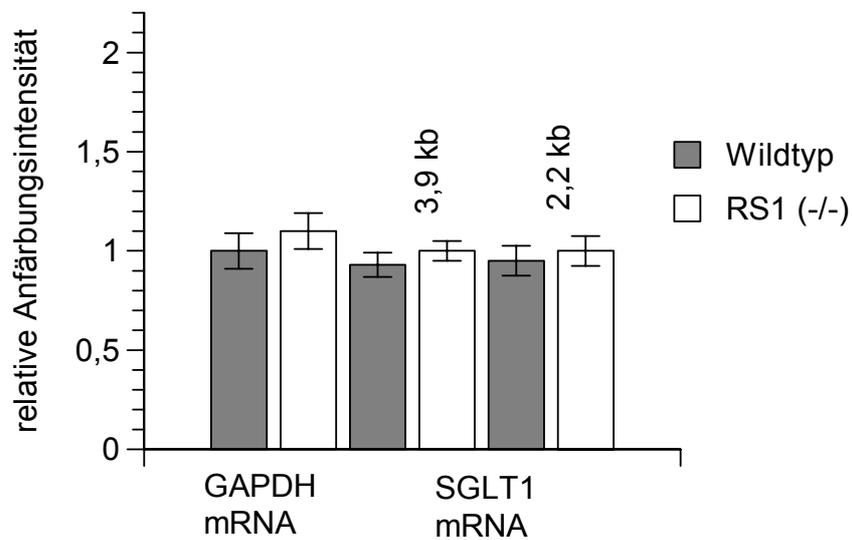
### 4.7.3 Untersuchung der SGLT1-mRNA-Expression am Darm

Die erhöhte SGLT1-Proteinexpression der RS1-knock-out Mäuse kann durch eine veränderte Transkription oder durch veränderte posttranskriptionale Regulation bedingt sein. Mit Hilfe von Northern-Blot Analysen wurde festgestellt, ob die veränderte Proteinmenge des  $\text{Na}^+$ -abhängigen D-Glukosetransporters auf eine veränderte RNA-Expression zurückzuführen ist. Bei der Untersuchung der m-RNA-Menge des Plasmamembrantransporters SGLT1 sollten ebenfalls statistische Aussagen getroffen werden. Deshalb wurden sechs Reaktionen aus zwei unabhängigen Experimenten ausgewertet. Es wurden Tiere aus der siebten und der achten Rückkreuzungsgeneration verwendet. In Abbildung 4-20a ist ein repräsentativer Northern-Blot gezeigt. Bezüglich der untersuchten m-RNA-Mengen waren keine signifikanten Unterschiede der SGLT1-Expression zwischen RS1-knock-out Mäusen und Kontrollmäusen zu finden. In Abbildung 4-20b ist die statistische Auswertung der erstellten Northern-Blots dargestellt. Zu diesem Zweck wurde die Intensität der Anfärbung auf den Röntgenfilmen der Northern-Blots ausgewertet. Auf die Normalisierung mit GAPDH bezogen, waren keine Unterschiede zu erkennen. Da die Transkription nicht verändert ist, weisen die Daten auf eine posttranslationale Hochregulation des Plasmamembrantransporters SGLT1 in RS1-knock-out Mäusen hin.



**Abb. 4-20a SGLT1-mRNA-Expression am Darm**

Für den Northern-Blot wurden je Spur 5 µg mRNA aus dem Darm im Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und hybridisiert. Als cDNA-Sonde gegen mSGLT1 wurde ein Fragment, das die Nukleotide 1-315 (Baumgarten, 1999) umfasste, eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Beladungskontrolle mit einer h-GAPDH-Sonde, Nukleotide 256-866 (# J02642) durchgeführt.

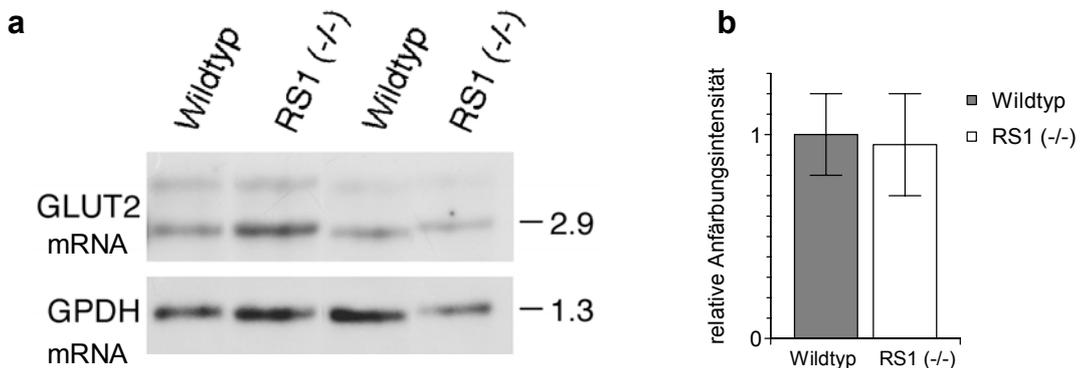


**Abb. 4-20b Densitometrische Quantifizierung der Northern-Blots**

mRNAs aus dem Darm auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer radioaktiven mSGLT1-Sonde markiert wurden einem Röntgenfilm exponiert. Die Intensität der Banden aus zwei unabhängigen Versuchen wurde quantifiziert (n=6).

#### 4.7.4 GLUT2 mRNA-Expression am Darm

Der Transporter GLUT2 ist neben dem Na<sup>+</sup>-abhängigen Glukosetransporter SGLT1 ebenfalls an der D-Glukosereabsorption beteiligt. Er ist basolateral lokalisiert und vermittelt den Transport aus den Enterozyten heraus (Hediger and Roads, 1994). Um festzustellen, ob die Expression des passiven Glukosetransporters GLUT2 in RS1-knock-out Mäusen verändert ist wurden zunächst mRNA-Analysen durchgeführt. Für die Northern-Blots wurde eine spezifische cDNA-Sonde gegen GLUT2 verwendet. In Abbildung 4-21 ist ein repräsentativer Northern-Blot gezeigt. Die Intensität der Banden schwankte etwas, auf die Beladungskontrolle mit GAPDH bezogen konnten keine signifikanten Unterschiede der RNA-Expressionen des GLUT2 zwischen RS1-knock-out Mäusen und Kontrollmäusen gefunden werden (Bild a). Reaktionen aus zwei unabhängigen Versuchen wurde quantifiziert (Bild b). Die mRNA-Expression des Glukosetransporters GLUT2 war bei den RS1-knock-out Mäusen nicht verändert.

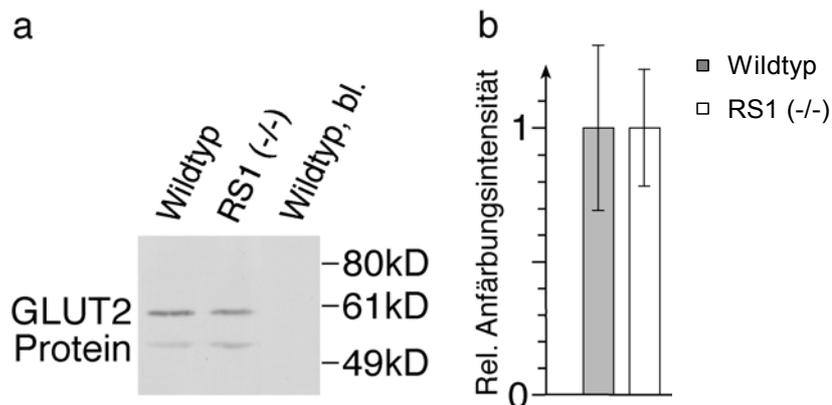


**Abb. 4-21 GLUT2-mRNA-Expression am Darm**

Je Spur wurden 5  $\mu$ g mRNA aus dem Darm im Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran gebliottet und hybridisiert. Als cDNA-Sonde gegen mGLUT2 wurde ein Fragment, das die Nukleotide 1580-1863 (# X15684) umfasste, eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Beladungskontrolle mit einer hGAPDH-Sonde, Nukleotide 256-866 (# J02642) durchgeführt. Bei den RS1-knock-out Mäusen und den Wildtypmäuse konnte ein vergleichbares Signal detektiert werden (Bild a) Die Intensität der Banden auf den Röntgenfilmen von vier Reaktionen aus zwei unabhängigen Versuchen wurde quantifiziert (Bild b).

#### 4.7.5 Quantifizierung der GLUT2-Proteinexpression am Darm

Da beim  $\text{Na}^+$ -abhängigen Glukosekotransporter SGLT1 trotz unveränderter mRNA-Mengen, ein erhöhte Proteinexpression gefunden wurde, wurde für den Glukose-transporter GLUT2 auch die Proteinexpression untersucht. Um ein Veränderung der Proteinmenge des passiven Glukosetransporters GLUT2 in RS1-knock-out Mäusen festzustellen, wurden mit einem GLUT2-Antikörper Western-Blots durchgeführt. Zum Nachweis wurde ein käuflicher, spezifischer Maus-GLUT2-Antikörper der Firma Alpha-Diagnostic International (San Antonio, USA) verwendet. Der Antikörper zeigte die Hauptreaktion bei kD 60 und eine schwache Reaktion bei kD 52. Beide Reaktionen konnten durch Inkubation mit dem Antigenpeptid blockiert werden. Im Gegensatz zum SGLT1 ließ sich in der Gesamtmembran des Darms der RS1-knock-out Maus keine veränderte Proteinexpression detektieren (Abb. 4-21a). Auch die densitometrische Quantifizierung der Western-Blots von vier Reaktionen aus zwei unabhängigen Experimenten deckte keine signifikanten Unterschiede der GLUT2-Expression zwischen RS1-knock-out Mäusen und Wildtypmäusen auf (Abb. 4-21b).



**Abb. 4-21 Expression des GLUT2-Proteins im Darm**

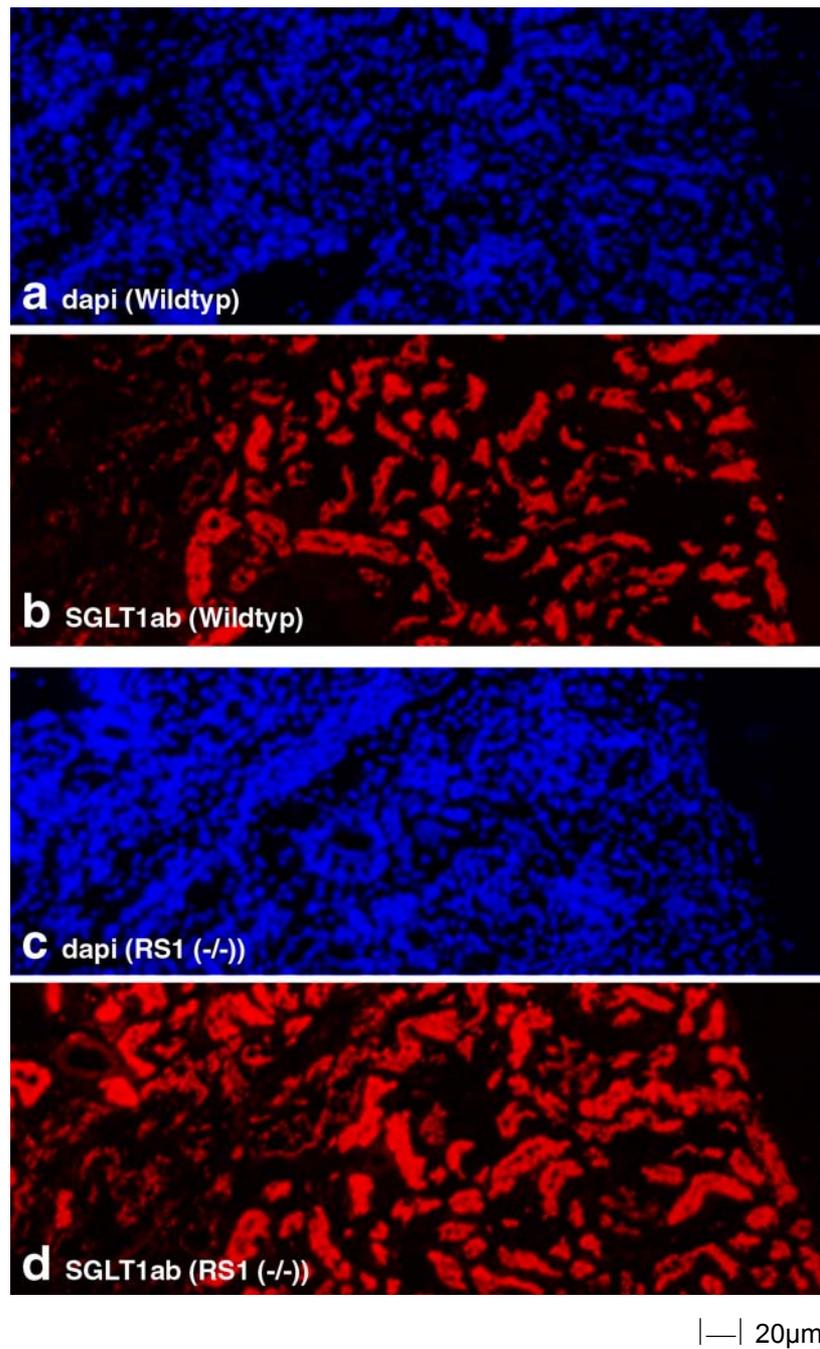
Die Proteinproben wurden in Laemmli-Puffer denaturiert und in der SDS-PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde für den Nachweis des mGLUT2 der käufliche affinitätsgereinigte mGLUT2-Antikörper in der Verdünnung 1:200 verwendet. Bei den RS1-knock-out Mäusen und den Wildtypmäuse konnte ein vergleichbares Signal detektiert werden (Bild a). Nach Präabsorption des Antikörpers war kein Signal zu erkennen (Bild a). Die Intensität der Banden auf den Röntgenfilmen von vier Reaktionen aus zwei unabhängigen Versuchen wurde quantifiziert (Bild b).

Die Hochregulation der D-Glukoseabsorption in RS1-knock-out Mäusen unterliegt nach diesen Ergebnissen nur der erhöhten Proteinexpression des  $\text{Na}^+$ -abhängigen D-Glukosekotransporters SGLT1 im Dünndarm, durch das Fehlen von RS1 bleibt die Regulation des passiven Glukosetransporters GLUT2 ist unbeeinflusst.

## 4.8 Expression des SGLT1 an der Niere

### 4.8.1 Immunhistologische Verteilung des SGLT1 an der Niere

Ähnlich wie in den Enterozyten des Dünndarms werden sowohl RS1 als auch der Na<sup>+</sup>-abhängige D-Glukosetransporter SGLT1 auch im proximalen Tubulus der Niere exprimiert (Reinhardt et al., 1999; Valentin et al., 2000). Um herauszufinden, ob die Hochregulation des SGLT1-Proteins gewebespezifisch für den Dünndarm ist, wurde die Verteilung des Na<sup>+</sup>-abhängigen D-Glukosetransporters in der Niere untersucht. Die Nieren von Wildtypmäusen und RS1-knock-out Mäusen wurden nach Genickbruch entnommen und in Isopentan schockgefroren. Am Kryotom wurden bei -16°C Objektträgertemperatur und -20°C Kammertemperatur 5 µm dicke Schnitte erstellt, mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und sofort mit dem polyklonalen, affinitätsgereinigten Peptidantikörper gegen mSGLT1 (187/V) inkubiert. Die Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt (Bild 4-23 a und c). Da das Gewebe vor der Entnahme nicht perfusionsfixiert wurde, sind die Nierentubuli teilweise kollabiert. Trotz der eingeschränkten Qualität der Schnitte ist sowohl bei den RS1-knock-out Mäusen als auch bei den Wildtypmäusen ein deutliches Signal in einem Teil der proximalen Tubuli zu sehen (Abb. 4-23 b und d). In den Gewebeprobe der RS1-knock-out Maus ist das Signal des Cy3-gekoppelten Antikörpers etwas stärker. Die Inspektion mehrerer Schnitte und eine Normalisierung auf die entsprechende DAPI-Anfärbung decken aber keine signifikanten Unterschiede auf.

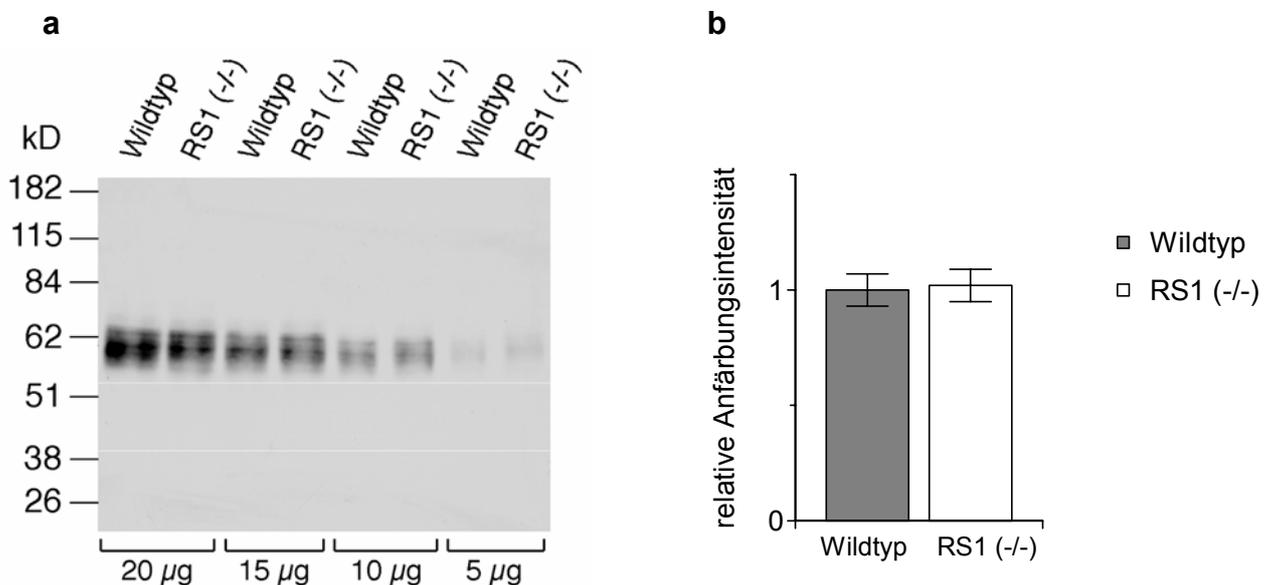


**Abb. 4-22 Immunhistologischer Nachweis von mSGLT1 an der Niere**

Reaktion des affinitätsgereinigten anti-SGLT1-Antikörpers (187 VI, Fraktion 7, Titer 1:1000, Verdünnung 1:200) an paraformaldehydfixiertem Gefrierschnitten von Mäusen. Auf Bild b ist die Reaktion des mSGLT1-Antikörpers mit dem Nierengewebe einer Wildtypmaus zusehen, auf Bild a die entsprechende DAPI-Kernanfärbung. Bild d zeigt die Reaktion an einer RS1-knock-out Maus, auf Bild c ist die entsprechende DAPI-Kernanfärbung dargestellt.

#### 4.8.2 Quantifizierung der SGLT1-Proteinexpression der Niere

Nachdem am Darm der RS1-knock-out Mäuse Veränderungen der Proteinexpression des Plasmamembrantransporters SGLT1 zu detektieren waren und an Hand der immunhistologische Aufnahmen der Niere nicht ganz eindeutig entschieden werden konnte, ob in der Niere von RS1-knock-out Mäusen eine erhöhte Expression von SGLT1-Protein zu beobachten ist, wurde auch die Niere mit Hilfe des Western-Blots untersucht. Dazu wurden Bürstensaummembranen aus Nieren von fünf Monate Alten weiblichen Mäusen isoliert (3.4.2.2), einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und einer Markierung mit dem Maus-SGLT1 Antikörper (187/VI) unterzogen. In den Proteinproben der Nieren konnten mittels des selbsterzeugten, affinitätsgereinigten, polyklonalen Peptidantikörpers keine signifikant unterschiedlichen Mengen des Na<sup>+</sup>-abhängigen D-Glukosekotrtransporters nachgewiesen werden (Bild 4-24a). Die Detektion der mSGLT1-Bande bei 60 kD konnte durch Präabsorption des Antikörpers mit dem antigenen Peptid blockiert werden (Daten nicht gezeigt). Nach densitometrischer Quantifizierung (Abb. 4-24b) wurde bestätigt, dass es in der Niere kein signifikanten Unterschiede zwischen RS1-knock-out Mäusen und Kontrollmäusen in Bezug auf die SGLT1-Proteinexpression gibt.

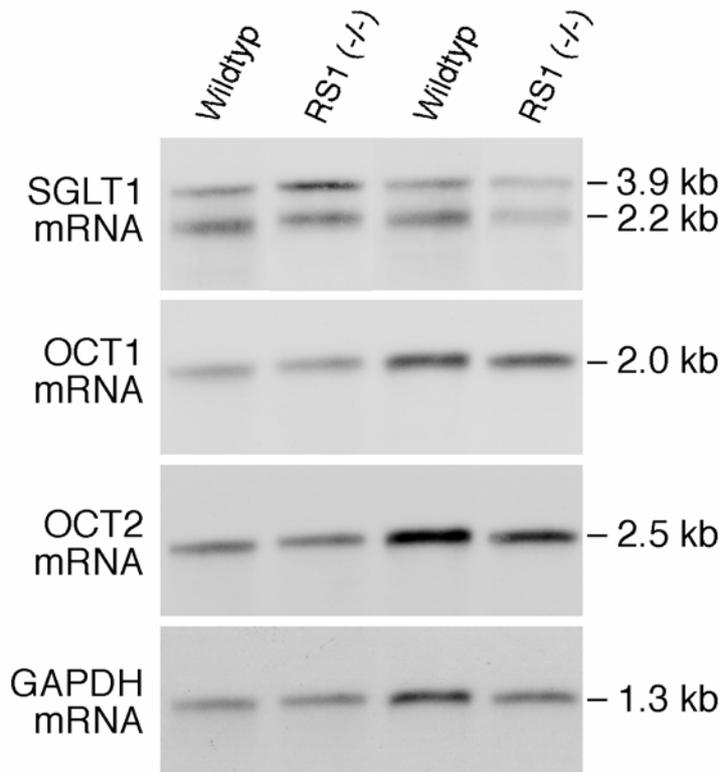


**Abb. 4-24 Quantifizierung des mSGLT1-Proteins in der Niere**

Bürstensaummembranen der Niere wurden in Laemmli-Puffer denaturiert und in der SDS-PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde für den Nachweis des mSGLT1 das affinitätsgereinigte anti-mSGLT1 Serum 187/VI (Sulfolinkreinigung, Fraktion 7, Verdünnung 1:400) verwendet. Der gezeigte Western-Blot wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Kühkamp erstellt. Bei den RS1-knock-out Mäusen und den Wildtypmäusen konnte ein vergleichbares Signal detektiert werden (Bild a). Die Intensität der Banden auf den Röntgenfilmen von vier Reaktionen aus zwei unabhängigen Versuchen wurde quantifiziert (Bild b).

### 4.8.3 Untersuchung der mRNA-Expression verschiedener Transporter an der Niere

Um zu überprüfen, ob trotz der unveränderten Proteinmengen mRNA-Unterschiede vorhanden sind, wurden Northern-Blot-Analysen durchgeführt. An einer renalen Nierenzelllinie (LLC-PK<sub>1</sub>), in der RS1 durch stabil transkribierte antisense RS1-mRNA funktionell ausgeschaltet war, konnten Veränderungen der mRNA-Expression festgestellt werden. In Northern-Blot-Hybridisierungen war im Vergleich zu den mit dem Leervektor transfizierten LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen ein deutlicher Anstieg der SGLT1-mRNA und ein leichter Anstieg der OCT2- und der GLUT1-mRNA zu verzeichnen (Korn, 1999). Ob ähnliche Veränderungen auch in den Nieren von RS1-knock-out Mäusen vorhanden sind, wurde geprüft. Neben der SGLT1-RNA-Expression wurden weitere Plasmamembrantransporter, für die keine Antikörper verfügbar waren, untersucht. Für die Untersuchung der mRNA-Expressionen wurden cDNA-Sonden gegen den Na<sup>+</sup>-abhängigen D-Glukosetransporter mSGLT1 und gegen die organischen Kationentransporter mOCT1 und mOCT2 verwendet.



**Abb. 4-25 m-RNA Expression verschiedener Plasmamembrantransportern in der Niere**

Für die Northern-Blots wurden je Spur 5µg mRNA aus der Niere im BES - Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und hybridisiert. Die eingesetzten Sonden waren cDNA-Sonden gegen mSGLT1 (Nukleotide 1-315; Baumgarten, 1999), mOCT1 (Nukleotide 1624-1826, # U38652), mOCT2 (Nukleotide 1684-1975, # AJ006036) und hGAPDH (Nukleotide 256-866, # J02642)

In Abbildung 4-25 ist ein repräsentativer Northern-Blot gezeigt. Zwischen RS1-knock-out Mäusen und Kontrollmäusen waren keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression des SGLT1, des OCT1 und des OCT2 zu finden. Die Northern-Blot-Analysen wurden vor der Rückkreuzung der Mäuse (in Zusammenarbeit mit Dr. Katharina Baumgarten) und mit der neunten Rückkreuzungsgeneration durchgeführt. Beide Untersuchungsreihen lieferten vergleichbare Ergebnisse.

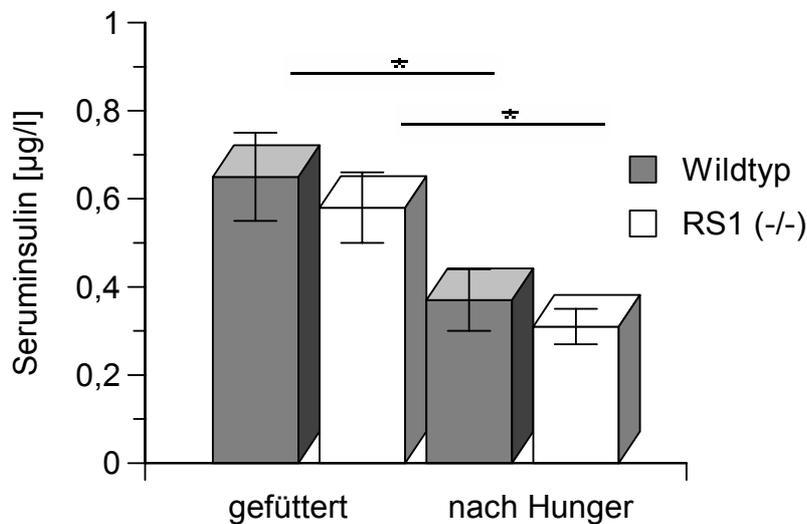
## 4.9 Insulin- und Leptinkonzentrationen im Blutserum

Bei den Mäusen ohne RS1 wurde eine erhöhte Fetteinlagerung nachgewiesen (4.3.4). Um herauszufinden, ob damit auch Veränderungen der Insulin- oder Leptinregulation einhergehen, wurden Insulin und Leptin genauer untersucht. Diese Peptidhormone beeinflussen den Zuckerhaushalt und den Fettstoffwechsel in komplexer Weise. Die erhöhte Konzentration des funktionell aktiven Na<sup>+</sup>-D-Glukosetransporter im Dünndarm von RS1-knock-out Mäusen sollte zu erheblichen postprandialen D-Glukose-Konzentrations-Spitzen in der Portalvene führen. Da solche Fluktuationen zu Änderungen der motorischen, der sekretorischen und der absorptiven Funktion des Dünndarms führen können, kann die Nahrungsumsetzung dadurch verbessert werden und dies könnte der Primärgrund für die Adipositas der RS1-knock-out Mäuse sein. Veränderungen der Glukosereabsorption der RS1-knock-out Mäuse könnte auch mit veränderten Seruminsulinkonzentrationen kombiniert sein. Zudem wären auch eine veränderte Serumleptinkonzentration in Erwiderung auf die erhöhte Fettmasse (Ahima and Flier, 2000) oder als Antwort auf geänderte Seruminsulinkonzentrationen (Kahn and Flier, 200; Moreno-Aliaga, 2001) bei den RS1-knock-out Mäusen denkbar. Da RS1 in Fettzellen exprimiert wird, ist es auch möglich, dass Expression und/oder Absonderung von Leptin direkt beeinflusst sind. Um diese Fragen zu klären, wurden Insulin- und Leptinkonzentrationen im Blutserum bestimmt.

### 4.9.1 Detektion von Insulin im Blutserum

Zum Nachweis von Maus-Insulin in Blutseren wurden Enzym-Immunoassays durchgeführt (3.4.6). Es wurden Blutseren von Tieren, die entweder Zugang zu Futter *ad libitum* hatten, oder von Tieren, die 24 Stunden lang Futterentzug ausgesetzt waren, abgenommen. Unter beiden experimentellen Bedingungen konnten für die Insulinkonzentrationen im Blut keine signifikanten Unterschiede zwischen RS1-knock-out Mäusen und Wildtypmäusen gezeigt werden (Abb. 4-26). Nach Hunger nahmen die Seruminsulinkonzentrationen beider Tiergruppen um ungefähr 50 % ab. Bei den Wildtyptieren sanken die Konzentrationen von  $0,65 \pm 0,10 \mu\text{g/l}$  auf  $0,37 \pm 0,07 \mu\text{g/l}$

und bei den RS1-knock-out Tieren von  $0,58 \pm 0,08 \mu\text{g/l}$  auf  $0,31 \pm 0,04 \mu\text{g/l}$  mit einer Signifikanz von  $p < 0,001$ .

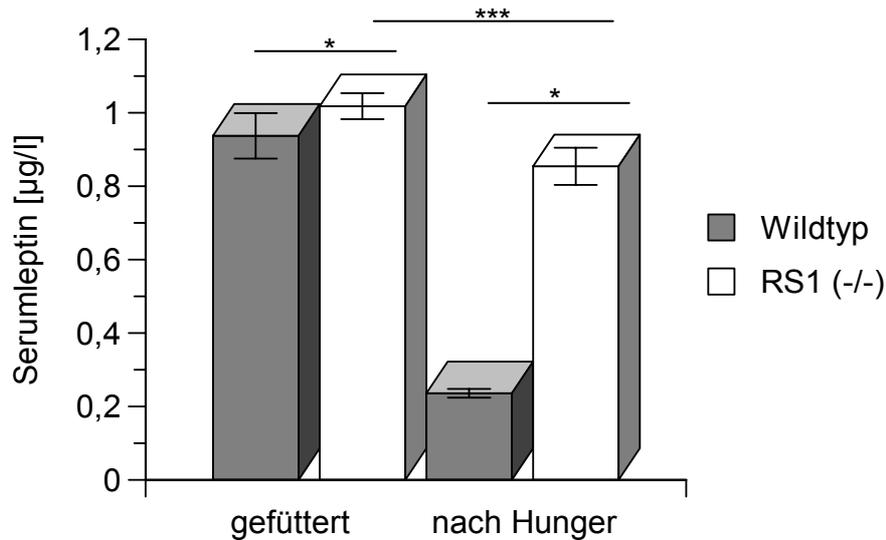


**Abb. 4-26 Insulinkonzentration im Blutserum**

Blutproben von fünf Monate alten RS1-knock-out Mäusen und Kontrollmäusen wurden zentrifugiert und sofort bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Vor der Blutabnahme hatte die eine Tiergruppe Zugang zu Futter ad libitum, die andere war 24 Stunden lang einem Futterentzug ausgesetzt, Wasser stand permanent zur Verfügung. Zum Nachweis von Maus-Insulin wurden ELISAs durchgeführt. ( $n=20$ ,  $*p < 0,001$ ).

#### 4.9.2 Detektion von Leptin im Blutserum

Maus-Leptin wurde im Blut ebenfalls mit einem käuflichen Enzym-Immunoassay nachgewiesen (3.4.5). Wiederum wurden Blutseren analysiert, die von Tieren, die freien Zugang zu Futter hatten, und von Tieren, die 24 Stunden lang nicht gefüttert wurden, stammten. Nach Durchführung der ELISAs wurden die Serumleptinkonzentrationen in Abbildung 4-27 verglichen. Bei den gefütterten RS1-knock-out Mäusen, war ein leichter, aber nur mäßig signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) gegenüber der gefütterten Wildtypmäusen zu beobachten. Bei RS1-knock-out Mäusen war eine Leptinkonzentration von  $1,02 \pm 0,03 \mu\text{g/l}$ , bei Wildtypmäusen von  $0,94 \pm 0,062 \mu\text{g/l}$  nachzuweisen. Nach 24 h Futterentzug sanken die Leptinkonzentration bei den Wildtypmäusen, wie erwartet (Frederich et al., 1995), um 74%. In Abweichung dazu nahmen die Leptinspiegel der RS1-knock-out Mäuse nur um 17 % ab. Nach Hungern waren die Leptinkonzentrationen der RS1(-/-)-Mäuse ( $0,85 \pm 0,05 \mu\text{g/l}$ ) signifikant größer verglichen mit den Konzentrationen der Wildtypmäuse ( $0,24 \pm 0,01 \mu\text{g/l}$ ) ( $P < 0,001$ ) (Abb. 4-27).



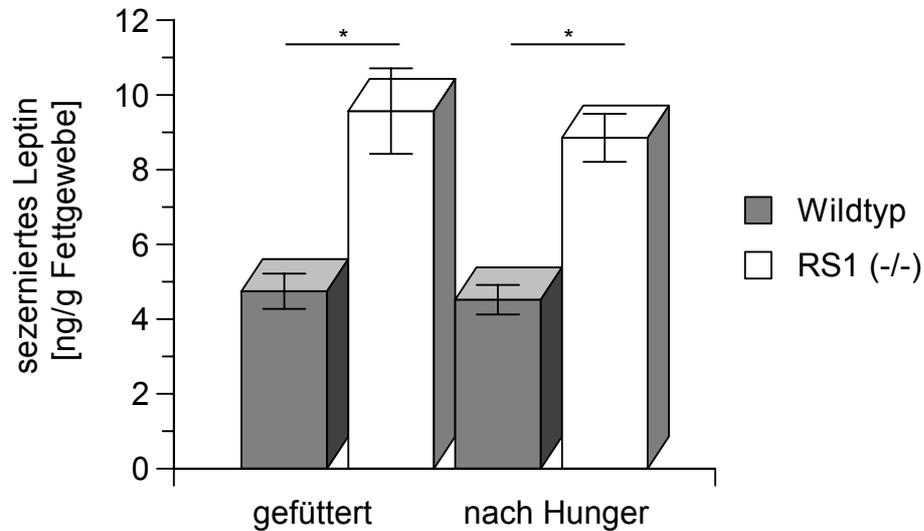
**Abb. 4-27 Leptinkonzentration im Blutserum**

Eine Gruppe von Tieren hatte Zugang zu Futter ad libitum, die andere war 24 Stunden lang einem Futterentzug ausgesetzt, Wasser stand permanent zur Verfügung. Die Mäuse waren fünf Monate alt, RS1-knock-out Mäuse und Kontrollmäuse stammten aus demselben Wurf der sechsten oder siebten Rückkreuzungsgeneration. Blutproben wurden aus der Schwanzspitze der entsprechenden Tiere entnommen, zentrifugiert und sofort bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zum Nachweis von Maus-Leptin wurden ELISAs nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  SE,  $n = 20$ , \* $p < 0,001$ , \*\*\* $p < 0,05$ .

#### 4.10 Untersuchung der Leptinsekretion an Fettzellexplantaten

Das Peptidhormon Leptin wird durch das ob-Gen kodiert und wird hauptsächlich im Fettgewebe exprimiert und sezerniert (Zhang et al., 1994). An Fettzellexplantaten wurde nun untersucht, ob die veränderten Serumleptinkonzentrationen der RS1-knock-out Mäuse mit einer veränderten Leptinsekretion des weißen Fettgewebes korreliert. Aus fünf Monate alten RS1-knock-out Mäusen beziehungsweise Kontrollmäusen wurde abdominal Fettgewebe entnommen und für 16 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  kultiviert (3.6.3). Als Nährmedium diente „Dulbecco's modified Eagle's medium“ (DMEM), das 5 mM Glukose enthielt. Nach 16 Stunden wurde das Medium abgezogen, die Explantate wurden gespült und neues DMEM-Medium hinzugegeben. Nach weiteren acht Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurden Aliquots aus dem Kulturmedium entnommen und darin die Leptingehalte mittels ELISA bestimmt (3.4.5). Die Fettzellen der RS1-knock-out Mäuse sezernierten signifikant mehr Leptin gleichgültig, ob sie aus Tieren explantiert worden waren, die vorher gefüttert wurden, oder von Tieren stammten, die 24 h vorher kein Futter zu Verfügung hatten (Abb. 4-28). Die RS1-knock-out Fettzellexplantate sonderten  $8,85 \pm 0,64$  ng/g Leptin bei Entnahme nach Futterentzug und

9,57 ± 1,15 ng/g bei Entnahme nach Fütterung ab, die Wildtypfettzellen bei entsprechender Präparation aber nur 4,52 ± 0,39 ng/g beziehungsweise 4,75 ± 0,47 ng/g.



**Abb. 4-28 Nachweis des mLeptin von Fettgewebsexplantaten sezerniert**

Aus gefütterten oder 24 h nicht gefütterten RS1-knock-out Mäusen bzw. Kontrollmäusen wurde Fettgewebe entnommen und in einer 6-Lochplatte bei 37°C kultiviert. In eine Vertiefung wurden je 200 mg Fettzellen in 10 ml DMEM (5 mM Glukose) gegeben. Nach 16 h wurde das Medium abgezogen, die Zellen mit PBS gespült und 5 ml neues DMEM-Medium hinzugegeben. Nach weiteren 8 h bei 37°C wurden 1 ml Aliquots des Kulturmediums abgenommen und die Leptingehalte mit ELISA bestimmt. Die Extinktionswerte der enzymatischen Reaktion wurden bei 450 nm mit dem ELISA-Reader gemessen. Die Messwerte wurden im Vergleich zu einer Standardreihe ausgewertet. Die Angaben sind Mittelwerte ± SE, n = 24- 38; \* p<0,000. Die Mäuse stammten aus der fünften, sechsten und siebten Rückkreuzungsgeneration.

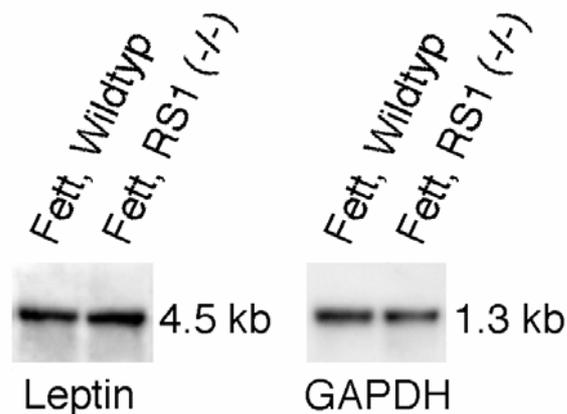
Die Ergebnisse zeigen, dass die Leptinsekretion der RS1-knock-out Mäuse in Anwesenheit von 5 mM D-Glukose und in Abwesenheit von Insulin im Vergleich zu den Wildtypmäusen erhöht ist. Das kann die erhöhten Serumleptinkonzentrationen der Mäuse ohne RS1 nach Futterentzug erklären. Bei gefütterten Mäusen ist das Leptin im Blutserum in Erwiderung auf Insulin hoch reguliert, so dass die Unterschiede zwischen RS1-knock-out Mäusen und Wildtypmäusen nicht so stark in Erscheinung treten.

## 4.11 Ursache der erhöhten Leptinsekretion

### 4.11.1 Untersuchung der Leptin-mRNA Expression

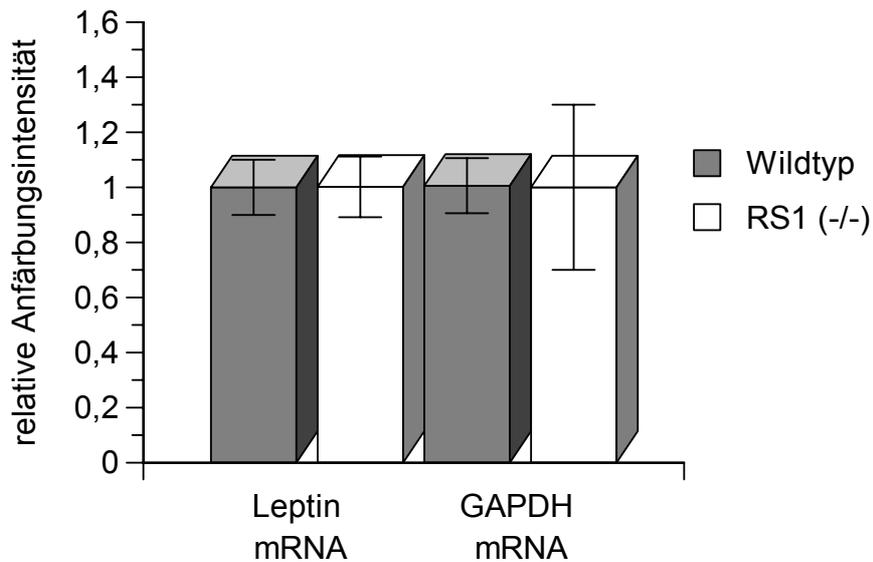
Zunächst wurde überprüft, ob der veränderten Leptinsekretion der RS1-knock-out Fettzellen eine veränderte mRNA-Expression im Fettgewebe zugrunde liegt. Zur Untersuchung der Leptin-mRNA-Menge wurden aus acht Würfen je eine RS1-knock-out Maus und eine Wildtypmaus des gleichen Geschlechts verwendet. Einer Tiergruppe wurde permanent Futter zur Verfügung gestellt, der anderen wurde kein Futter geboten. Aus abdominalem Fettgewebe der fünf Monate alten Mäuse wurden mRNAs isoliert und diese in Northern-Blots untersucht. In Abbildung 4-29a ist ein repräsentativer Northern-Blot von Tieren, die gefüttert worden sind, gezeigt. Bezüglich der untersuchten m-RNA-Mengen waren weder nach Fütterung, noch nach Hunger (Daten nicht gezeigt) signifikante Unterschiede der Leptin-Expression zwischen RS1-knock-out Mäusen und Kontrollmäusen zu finden. In Abbildung 4-29b ist die statistische Auswertung der durchgeführten Northern-Blots dargestellt. Zu diesem Zweck wurde von fünf Reaktionen aus drei unabhängigen Versuchen die Intensität der Anfärbung auf den Röntgenfilmen ausgewertet. Auf die Normalisierung mit der Beladungskontrolle GAPDH bezogen, waren keine Unterschiede zu erkennen.

Die erhöhte Leptinsekretion der Fettzellen ist nach diesen Ergebnissen nicht auf eine Veränderung der Transkription zurückzuführen.



**Abb. 4-29a mRNA- Expression von Leptin im Fettgewebe**

Abdominales Fettgewebe wurde aus Tieren, denen permanent Futterentzug zur Verfügung stand, entnommen und zur Isolation von mRNAs verwendet. Für den Northern-Blot wurden 5 µg mRNA je Spur aufgetrennt, geblottet und hybridisiert. Als mLeptin-Sonde wurde ein Fragment, das die Nukleotide 88-501 (# U22421) umfasste, eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Beladungskontrolle mit einer hGAPDH-Sonde, Nukleotide 256-866 (# J02642) durchgeführt. Die Tiere stammten aus der achten Rückkreuzungsgeneration.

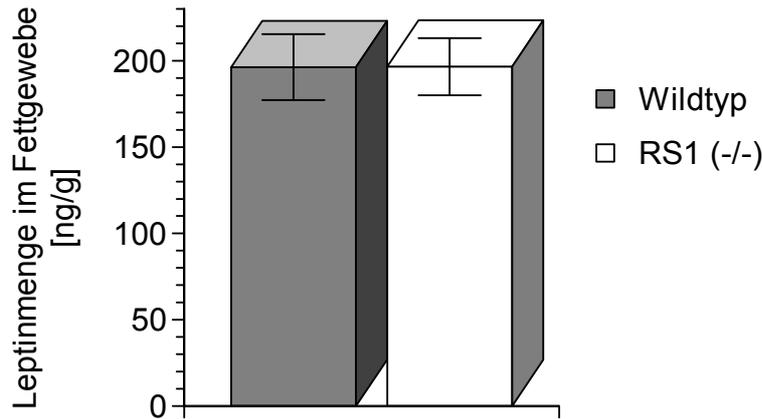


**Abb. 4-29b Quantifizierung der Northern Blot Hybridisierung mit mLeptin**

Northern-Blots von m-RNA aus Fettgewebe, mit einer mLeptin-Sonde radioaktiv markiert, wurden Röntgenfilmen exponiert. Die Intensität der Banden von fünf Reaktionen aus drei unabhängigen Versuchen wurde quantifiziert.

#### 4.11.2 Untersuchung der Proteinexpression des Leptins

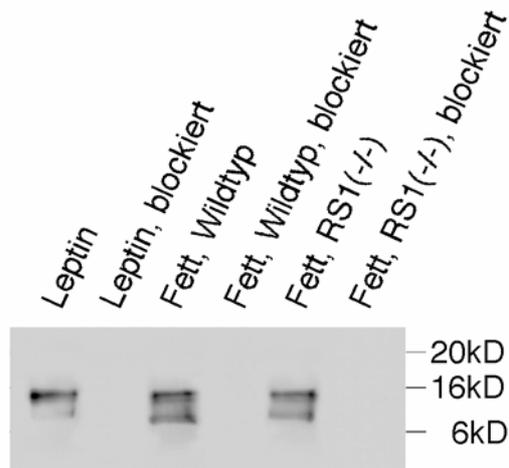
Nach den Daten beruht die erhöhte Leptin-Sezernierung von RS1-knock-out Maus Fettgewebe nicht auf einer erhöhten Transkription des ob-Gens. Um herauszufinden, ob eine Veränderung der Leptin-Proteinexpression Ursache für die erhöhte Leptinsekretion der RS1-knock-out Mäusen ist, wurden ELISAs (3.4.5) durchgeführt. Zu dieser Analyse wurde Fettgewebe aus dem Bauchraum von 24 Stunden nicht gefütterten und gefütterten Mäusen entnommen und homogenisiert (3.4.2.5). Nach Zentrifugation wurden überflüssige Zelltrümmer abgetrennt. Die Suspensionen der Fettgewebshomogenisate wurden in Enzym-Immunoassays eingesetzt. Es konnten weder signifikante Unterschiede zwischen gefütterten (Abb. 4-30) und ungefütterten Tieren (Daten nicht gezeigt) gefunden werden, noch zwischen RS1-knock-out- und Wildtyp-tieren. Im Fettgewebe der RS1-knock-out Mäusen waren  $197 \pm 17$  ng/g Leptin nachzuweisen, in dem Gewebe der Wildtypmäuse  $196 \pm 19$  ng/g ( $n=8$ ) (Abb. 4-30). Die Tiere stammten aus der sechsten Rückkreuzungsgeneration.



**Abb. 4-30 Nachweis des mLeptin im Fettgewebe mittels ELISA**

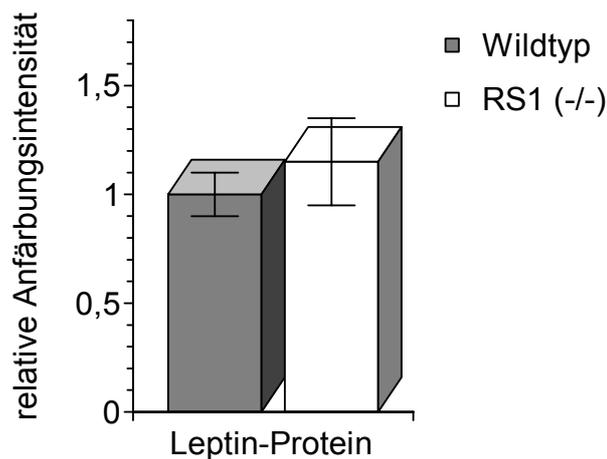
Abdominales Fettgewebe von gefütterten Tieren wurde in Saccharose-Puffer homogenisiert. Zelltrümmer wurden mittels zweimaliger Zentrifugation bei 150 xg abgetrennt. Mit den Proteinproben wurde zum Nachweis von Maus-Leptin ELISAs durchgeführt. Die Extinktionswerte der enzymatischen Reaktion wurde bei 450 nm mit dem ELISA-Reader gemessen. Im Vergleich zu einer Standardreihe wurden die Messwerte ausgewertet. Mittelwerte  $\pm$  SE,  $n = 8$ .

Die Daten deuten darauf hin, dass die Proteinexpression trotz veränderter Leptinsekretion nicht erhöht ist und zudem unabhängig vom Hungerzustand ist. Da bei der Herstellung der Fettzellhomogenisate nur die Zelltrümmer abgetrennt wurden, sollte ausgeschlossen werden, dass es bei dem ELISA-Test zu Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen kam. Es wurde zusätzlich Western-Blots durchgeführt. Bei der Western-Blot-Analyse war eine Spezifitätskontrolle durch die Höhe der Proteinbande möglich. Die Fettgewebshomogenisate und gereinigtes Leptin (Positivkontrolle) wurden einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und der Markierung mit dem Maus-Leptin Antikörper (Santa Cruz, Kanada) unterzogen. In den Proteinproben des Fettgewebes der RS1-knock-out Mäuse konnten keine signifikant erhöhten Mengen des Peptidhormons nachgewiesen werden. Die Detektion mit einem käuflichen Maus-Leptin-Antikörper ergab ein Bande bei 16 kD und eine bei 10 kD, die auch mit der Positivkontrolle (Leptin, DSL, Sinsheim) zu erhalten waren (Abb. 4-31a). Durch Präabsorption des Antikörpers mit dem antigenen Peptid konnten die Reaktionen blockiert werden. In Abbildung 4-31b ist die statistische Auswertung von fünf Reaktionen aus zwei unabhängig durchgeführten Western-Blots zu sehen. Die verwendeten Tiere waren weiblich und fünf Monate alt und stammten aus der achten Rückkreuzungsgeneration.



**Abb. 4-31a Proteinexpression von Leptin im Fettgewebe**

Western-Blot: Fettgewebe wurde in Saccharose-Puffer homogenisiert. Danach wurden Zelltrümmer aus dem Homogenisat entfernt. Die Proteinproben wurden in Laemmli-Puffer denaturiert und in der SDS-PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Pro Spur wurden 25 µg Fettgewebshomogenisat bzw. 0,2 µg Leptin aufgetragen. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde für den Nachweis des mLeptins ein käuflicher Antikörper (Santa Cruz; Kanada) in der Verdünnung 1:500 verwendet.



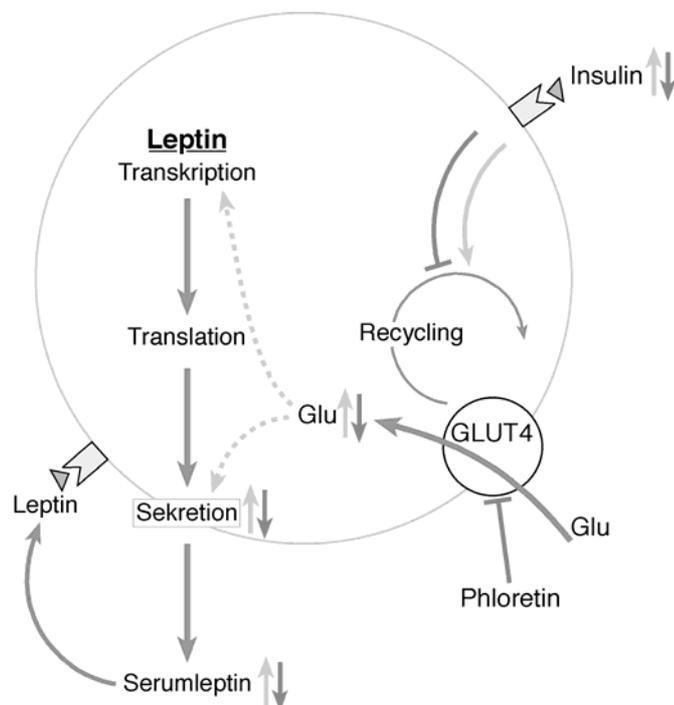
**Abb. 4-31b Densitometrische Quantifizierung der Western-Blots**

Proteinaufarbeitungen aus dem Fettgewebe wurden im SDS-Page aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und mit dem Antikörper gegen mLeptin inkubiert. Die Intensität der Banden auf den Röntgenfilmen wurde quantifiziert. Die statistische Auswertung wurde von fünf Reaktionen aus zwei unabhängig durchgeführten Western-Blots ermittelt (n=5). Mittelwerte  $\pm$  SE.

Die Western-Blots lieferten vergleichbare Ergebnisse wie die ELISA-Tests. Die Leptinsynthese ist im Gegensatz zur Leptinsekretion bei den RS1-knock-out Mäusen nicht verändert. Anzumerken ist, dass die Leptinexpression in den Fettzellen 40mal beziehungsweise 20mal höher ist als die Leptinsekretion innerhalb von acht Stunden. Eine erhöhte Sekretion ist also nicht zwingend von einer erhöhten Proteinexpression abhängig.

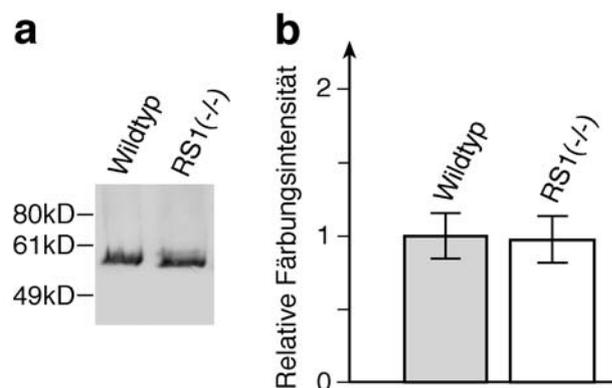
### 4.11.3 Beeinflussung der Leptinsekretion durch den Glukose Transporter GLUT4

Die Sekretion von Leptin aus der Fettzelle kann durch viele Faktoren beeinflusst werden (Abb. 4-32). Es wurde beschrieben, dass die Leptinexpression durch den insulinstimulierten Glukose-Metabolismus, der in Fettzellen von der Aktivität des Glukosetransporters GLUT4 abhängig ist, reguliert wird (James and Piper, 1994; MacDougald et al. 1995; Mueller et al., 1998). Insulin steigert in Fettzellen durch Rekrutierung von GLUT4 in die Plasmamembran die Glukoseaufnahme (James et al., 1994; Sivitz et al., 1997). Die Leptinfreisetzung wird durch den Glukosetransporter GLUT4 verändert. Der insulinsensitive Plasmamembrantransporter bringt Glukose in das Innere der Adipozyten und steigert dadurch die Leptinsekretion. GLUT4 ist durch Phloretin hemmbar, gleichzeitig wird auch die Leptinsezernierung inhibiert (Wellhoerner et al., 2000). Die Leptinsekretion kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. Durch mRNA-Veränderungen ist ein Kontrolle auf Transkriptionsebene möglich (Moreno-Aliaga et al., 2001). Auch im Bereich der Translation oder direkt bei der Sekretion ist eine Regulation denkbar. Mittels eines Leptinrezeptors, der direkt an der Fettzelle sitzt, ist eine schnelle Beeinflussung der Leptinsezernierung gegeben (Ahima und Flier, 2000). Einige Regulationswege werden in Abbildung 4-32 dargestellt.



**Abb. 4-32 Regulationsmechanismen des Leptin in der Fettzelle**

Eine Veränderung der Regulation auf Transkriptions- oder Translationsebene wurde bereits ausgeschlossen. Um zu überprüfen, ob die Veränderungen der Leptinsekretion der RS1-knock-out Maus-Fettzellen aus einer Hochregulation des Plasmamembrantransporters GLUT 4 resultiert, wurde mit Western-Blots die Proteinexpression des GLUT4 analysiert. Zu diesem Zweck wurden Fettgewebe aus RS1-knock-out Mäusen und Wildtypmäusen entnommen, die 24 Stunden lang nicht gefüttert worden sind. Angereicherte Plasmamembranfraktionen des Fettgewebes wurden isoliert (3.4.2.1), einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und der Markierung mit einem käuflichen Maus-GLUT4 Antikörper (DPC Biermann, Bad Nauheim) unterzogen. Mit dem Antikörper erhielt man eine spezifische Bande bei 55 kD. In den Proteinproben des Fettgewebes konnten mittels des affinitätsgereinigten Peptidantikörpers keine signifikant unterschiedlichen Mengen des Na<sup>+</sup>-unabhängigen D-Glukosetransporters GLUT4 nachgewiesen werden (Bild 4-33). Die Detektion der mGLUT4-Bande konnte durch Präabsorption des Antikörpers mit dem antigenen Peptid blockiert werden (Daten nicht gezeigt). Die verwendetes Gewebe stammten von Tieren der siebten und achten Rückkreuzungsgeneration.



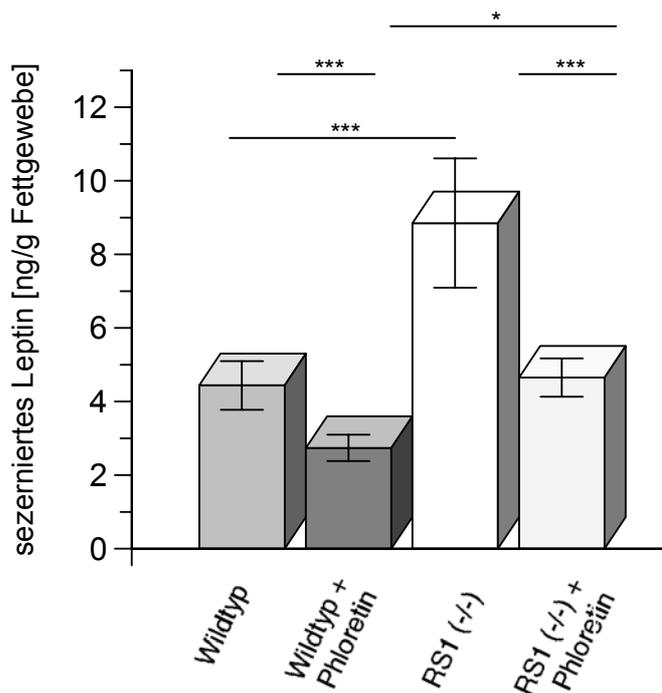
**Abb. 4-33 Regulation der Leptinsekretion durch GLUT4 in Fettzellexplantaten**

Angereicherten Plasmamembranfraktionen des Fettgewebes wurden in Laemmli-Puffer denaturiert und in einer SDS-PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde für den Nachweis ein käufliches, affinitätsgereinigtes anti-mGLUT4-Serum in der Verdünnung 1:200 verwendet. In den Western-Blots wurden 10 µg Protein pro Spur aufgetragen. Zwischen den Proben der Wildtypmäuse und der RS1-knock-out Mäuse konnten keine signifikant unterschiedlichen Signale detektiert werden (Bild a). Die Intensität der Banden auf den Röntgenfilmen wurde von fünf Reaktionen aus zwei unabhängigen Western-Blots quantifiziert (Bild b).

Die Western-Blots unterschieden allerdings nicht zwischen funktional aktivem GLUT4-Protein in der Plasmamembran und GLUT4-Protein in subapikalen Vesikeln. Um die GLUT4 Transporter, die relevant für die Modulation der Leptinsekretion sind, in RS1-

knock-out Mäusen und Wildtypmäuse zu vergleichen, wurde die Inhibition der Leptinsekretion durch Phloretin und die Stimulation durch Insulin gemessen.

Um die Wirkung von Phloretin auf Fettzellexplantate aus RS1-knock-out Mäusen und Wildtypmäusen zu testen, wurden Fettzellexplantate wie in Kapitel 3.6.3 beschrieben kultiviert. Zu einem Teil der Explantate wurde Phloretin in einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  gegeben. Aus dem Kulturmedium wurden Aliquots entnommen und die Leptingehalte mittels ELISA bestimmt (3.4.5). Die Fettzellen sezernierten unter Phloretinzugabe signifikant weniger Leptin verglichen mit den entsprechenden Kontroll-explantaten. Die Fettzellexplantate aus RS1-knock-out Mäusen sezernierten  $8,85 \pm 1,76$  ng/g Leptin bei Kultivierung unter Normalbedingungen und  $4,65 \pm 0,52$  ng/g unter Zugabe von Phloretin. Im Kulturmedium der Wildtypfettzellexplantate konnten  $4,44 \pm 0,66$  ng/g und mit Phloretinzugabe nur  $2,74 \pm 0,36$  ng/g Leptin detektiert werden. Die Leptinsekretion wurde durch Phloretin um  $48 \pm 21$  % beziehungsweise um  $38 \pm 17$  % gehemmt.

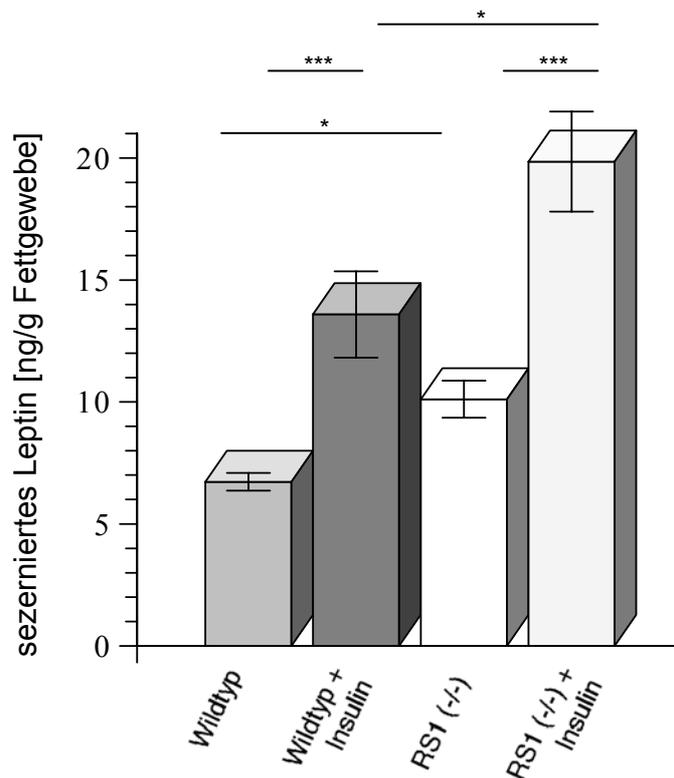


**Abb. 4-34 Leptinsekretion von Fettgewebsexplantaten in An- und Abwesenheit von Phloretin**

Fettzellexplantate wurden 16 h in 10 ml DMEM mit 5 mM Glukose gegeben. Nach Wechsel des Mediums wurde bei einer Versuchsgruppe Phloretin in einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  zugesetzt. Nach acht Stunden wurden Proben aus dem Kulturmedium entnommen und die Leptingehalte mittels ELISA bestimmt (Mittelwerte  $\pm$  SE,  $n = 10$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*  $p < 0,05$ ).

Insulin wirkt stimulierend auf den Einbau des Plasmamembrantransporters GLUT4 in Fettzellen, dies führt zu einer gesteigerten Leptinsekretion (Sivitz et al., 1997; James

et al., 1994). Wie bereits beschrieben wurden auch zu diesem Versuchsansatz Fettzellexplantate aus RS1-knock-out Mäusen und Wildtypmäusen entnommen und bei 37°C kultiviert. Zu einem Teil der Fettexplantate wurde humanes Insulin (ICN, Eschwege) in einer Endkonzentration von 1,7 µM gegeben. Die Leptingehalte wurden nach acht Stunden wiederum mittels ELISA bestimmt. Auch die Stimulation der Leptinsekretion durch die Aktivierung von GLUT4 mit Insulin war in den beiden Versuchsgruppen in Relation zu der unterschiedlichen Basissekretion nicht signifikant unterschiedlich. Die Fettzellen beider Tiergruppen sezernierten unter Insulinbelastung signifikant mehr Leptin (Abb. 4-35). Die RS1-knock-out Fettzellexplantate sezernierten  $19,85 \pm 2,05$  ng/g Leptin bei Kultivierung mit Insulin und  $10,11 \pm 0,76$  ng/g unter Standardbedingungen. Bei entsprechender Präparation gaben die Wildtypfettzellen mit Insulin  $13,59 \pm 1,77$  ng/g und ohne Insulin  $6,67 \pm 0,36$  ng/g Leptin ab. Bei Zugabe von Insulin stieg die Leptinsekretion der Fettzellexplantaten um  $96 \pm 22$  % bei RS1-knock-out Fettzellen und um  $104 \pm 27$  % bei Wildtyp Fettzellen an.



**Abb. 4-35 Leptinsekretion von Fettgewebsexplantaten in An- und Abwesenheit von Insulin**

Fettzellexplantate wurden 16 h in 10 ml DMEM mit 5 mM Glukose gegeben. Das Medium wurde abgezogen und neues hinzugegeben. Bei einer Versuchsgruppe wurde zum Medium 3,3 nM Insulin gegeben. Nach acht Stunden wurden Proben aus dem Kulturmedium entnommen und die Leptingehalte mit ELISA bestimmt (Mittelwerte  $\pm$  SE, n = 10; \*\*\* p<0,001; \* p<0,05).

Da weder die GLUT4-vermittelte Stimulation der Leptinsekretion durch Insulin noch die Hemmung durch Phloretin bei RS1-knock-out Mäusen signifikant verändert war, ist der Anstieg der Leptinsekretion bei den RS1-knock-out Mäusen unabhängig vom Glukosetransporter GLUT4. Die postulierten Regulationsmechanismen der Leptinsekretion über den GLUT4 funktionieren auch bei den RS1-knock-out Mäusen. Die Veränderungen der Leptinsekretion bei den RS1-knock-out Mäusen sind dementsprechend nicht auf eine unterschiedliche Repräsentation des GLUT4 in der Plasmamembran der Fettzellen zurückzuführen.

Die Daten weisen darauf hin, dass nur die Ausscheidung von Leptin, möglicherweise durch eine veränderte Exozytose, gesteigert ist.

## 5 Diskussion

### 5.1 Lokalisation und Funktion des RS1- Proteins

Das RS1-Protein zeichnet sich durch seine Lokalisation an der Membran und im Kern aus (Valentin et al, 2000; Kühlkamp, 2002). Die Lokalisation konnte am Darm der Maus bestätigt werden. RS1 konnte in dieser Arbeit das erste Mal an Dünndarmschnitten der Maus immunhistochemisch dargestellt werden, es war deutlich im Kern und an der Membran zu sehen. Der dualen Lokalisation von RS1 können verschiedene Funktionen zugeordnet werden. Das Protein scheint auch auf zwei völlig unterschiedlichen Ebenen regulierend zu wirken. An der Plasmamembran ist RS1 an der Endozytose und am „turnover“ von Plasmamembranproteinen beteiligt. Dabei besteht offensichtlich Selektivität für eine bestimmte Gruppe von Plasmamembrantransportern und insbesondere für den  $\text{Na}^+$ -D-Glukosetransporter SGLT1. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Plasmamembranoberfläche bei hRS1 exprimierenden Oozyten reduziert ist (Valentin et al, 2000). Zusätzlich zeigen neue Daten bezüglich der Funktion des RS1 vom Menschen und vom Schwein, dass RS1 nicht nur dynamische Endozytoseprozesse stimuliert, sondern auch Exozytoseprozesse beeinflusst (Veyhl et al., 2003). Zum anderen verringert die Koexpression von hRS1 und hSGLT1 in *Xenopus laevis* Oozyten die Maximalgeschwindigkeit des exprimierten Transporters und gleichzeitig die Menge von hSGLT1 in der Plasmamembran (Reinhardt et al., 1999). Die beobachteten Effekte nach der cRNA-Injektion sind transkriptionsunabhängig, denn sie sind auch nach Blockade der Transkription mit Actinomycin D zu sehen. Zudem konnten die Effekte auch ermittelt werden, wenn dialysiertes Zytosol aus hRS1 exprimierenden Oozyten in hSGLT1 exprimierende Oozyten injiziert wurde (Veyhl, persönliche Mitteilung 2002). Auch bei der RS1-knock-out Maus konnten durch das Ausschalten von RS1 posttranskriptionale Veränderungen am Darm festgestellt werden, auf die später noch genauer eingegangen werden soll.

Die Funktion des RS1-Proteins im Zellkern wurde durch Untersuchungen an LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen gezeigt. Nach Reduzierung des endogenen pRS1 mittels einer stabilen antisense Strategie in LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen konnten erhöhte mRNA- und Proteinmengen des  $\text{Na}^+$ -abhängigen Glukosetransporter SGLT1 gefunden werden. Dementsprechend waren in RS1-überexprimierenden Zelllinien SGLT1-mRNA und SGLT1-Protein in der Plasmamembran drastisch erniedrigt (Korn et al., 2001). Dass diese Effekte auf Änderungen der Transkription beruhen, wurde in dieser Arbeit mit Hilfe eines Run-off Assays an isolierten Zellkernen von RS1-antisense Zellen nachgewiesen (Anhang).

Demzufolge hemmt RS1 die Transkription von SGLT1 in konfluenten LLC-PK<sub>1</sub> Zellen. Da gezeigt worden ist, dass RS1 beziehungsweise Spaltprodukte des RS1 in den Zellkern gelangen können (Kühlkamp, 2001), ist anzunehmen, dass RS1 seine Wirkung auf die Transkription im Zellkern entfaltet. Es ist eine direkte Interaktion von RS1 oder von RS1-Spaltprodukten denkbar. Die regulatorische Funktion des RS1 wurde weiter durch die Beobachtung, dass das RS1-Protein eine UBA-Domäne (ubiquitin binding associated domain) besitzt und tetrameres Ubiquitin binden kann (Akimjanova et al, 2003), untermauert. Derzeitige Daten deuten auf eine komplexe Rolle des RS1 bei der Regulation des SGLT1 und anderer Plasmamembrantransporter hin. Die posttranskriptionale Herunterregulation des Plasmamembranproteins scheint von der Wanderung des RS1-Fragments in den Zellkern und der Hemmung der Transkription von SGLT1 begleitet zu sein.

## 5.2 Untersuchung der RS1-knock-out Maus

Eine eindrucksvolle Demonstration einer wichtigen physiologischen Funktion von RS1 an der Plasmamembran ist durch die Erzeugung und Analyse der RS1-knock-out-Maus gelungen. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst gezeigt, dass bei der RS1-knock-out Maus tatsächlich das RS1-Gen ausgeschaltet ist, keine mRNA transkribiert und kein RS1-Protein translatiert wird. Da die Reduktion des RS1 Proteins in LLC-PK<sub>1</sub>-Zelle zu einem Anstieg der mRNA-Menge verschiedener Transporter führt (Korn et al., 1999; Anhang), wurden zuerst Analysen der Transkripte an der RS1-knock-out Maus ins Auge gefasst. Dr. Katharina Baumgarten, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg hatte bereits 1999 einige anfängliche RNA-Untersuchungen von Plasmamembrantransportern in Niere, Leber und Gehirn an der RS1-knock-out Maus durchgeführt, die zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen knock-out Maus und Wildtypmaus führten. In dieser Arbeit wurden verschiedene Parameter zur Charakterisierung der RS1-knock-out Maus gründlicher untersucht.

### 5.2.1 Phänotyp der RS1-knock-out Maus

Das Entfernen des ubiquitär exprimierten, Ubiquitin-bindenden RS1-Proteins führt bei der Maus zu einem spezifischen Phänotyp. Die RS1-knock-out Mäuse sind vermehrungsfähig und weisen nach fünf bis sechs Monaten eine Adipositas mit bis zu 30 % mehr Körpergewicht und bis zu 80 % mehr Fett als die vergleichbaren Wildtypmäuse auf, wobei das relative Fettzellvolumen der RS1-knock-out Mäuse um etwa 40 % vergrößert ist. Die bei weitem größte relative Änderung im Vergleich zu den Wildtypmäusen wurde beim Fettgehalt beobachtet, jedoch tragen Änderungen des Wassergehalts und der getrockneten, fettfreie Körpermasse ebenfalls zu der Steigerung des Gesamtkörpergewichts der transgenen Mäuse bei. Die Zunahme des Körperfetts der RS1-knock-out Mäuse ist zum Teil durch Vergrößerung, zum Teil aber auch durch Vermehrung der Fettzellen bedingt. Durch Analysen des Fressverhaltens und Beobachtungen der motorischen Aktivität konnte sichergestellt werden, dass die Ursache des Phänotyps nicht in einer gesteigerten Aufnahme an Futter und auch nicht in einem reduzierten Bewegungsbedarf zu finden ist.

RS1 ist in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben exprimiert und beeinflusst neben anderen Plasmamembrantransporter (GLUT1, OCT2) vor allem den Na<sup>+</sup>-abhängigen Glukosekotrporter SGLT1, der hauptsächlich in Darm und Niere exprimiert wird. Um den Ursachen der Adipositas und den Auswirkungen des Fehlens von RS1 auf den Grund zu gehen, wurden Darm, Niere und Fettgewebe ausführlicher untersucht.

### 5.2.2 Auswirkungen auf Darm und Niere

In der Bürstensaummembran des Dünndarmepithels der RS1-knock-out Mäuse ließ sich eine siebenfach erhöhte Menge des luminalen SGLT1-Proteins nachweisen. Die Konzentration des basolateralen Glukosetrporter GLUT2 war im Gegensatz dazu nicht verändert. In immunhistologischen Anfärbungen wurde deutlich mehr SGLT1 bei der RS1-knock-out Maus in und auch unter der Membran detektiert. Da keine mRNA-Veränderung des SGLT1 am Darm gezeigt werden konnten, war nachgewiesen, dass die Zunahme der Mengen an SGLT1-Protein posttranskriptional bedingt ist. Am Darm der RS1-knock-out Maus wirkt sich der auch nach Koexpression in den Oozyten beobachtete Effekt an der Plasmamembran aus, während die in den LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen vorhandene Transkriptionsbeeinflussung im Zellkern nicht zum Tragen kommt. Zudem ist die Wirkung des RS1 am Darm selektiv für den Na<sup>+</sup>-abhängigen Glukosekotrporter SGLT1, da die GLUT2-Proteinexpression nicht verändert ist. In einer *ex vivo* Darmperfusion konnte gezeigt werden, dass die RS1-knock-out Mäuse bei einer Bolusbelastung von 1 g D-Glukose mehr als die zweifache Menge Glukose aus dem

Dünndarm in die Pfortader resorbieren können. Bei einem Glukosebelastungstest mit ösophagealer Glukosegabe waren die Blutzuckerwerte in der Schwanzvene dagegen nicht erhöht. Im Darm könnte der Einfluss des RS1 auf die Endozytose gegenüber dem Einfluss auf die Transkription überwiegen. Bei der RS1-knock-out Maus muss auch der „turnover“ des Na<sup>+</sup>-abhängigen Glukosekotransporter SGLT1 beeinflusst sein, da die siebenfache SGLT1-Proteinmenge einem verdoppelten Transport über den SGLT1 gegenübersteht. Eine reine Steigerung des Einbaus würde die Steigerung der Proteinmenge nicht erklären. Bei den RS1-knock-out Mäusen wird mehr SGLT1 translatiert, aber auch mehr SGLT1 wieder abgebaut. RS1 scheint bei den normalen Mäusen eine stabilisierende Wirkung auf den SGLT1 zu haben, die durch die UBA-Domäne vermittelt sein könnte (Buchberger, 2002). Beim Ausschalten des RS1 könnte bei den Mäusen eine andere Gegenregulation auf das Fehlen von RS1 erfolgen als bei den LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen. Der Mechanismus der posttranskriptionalen Herunterregulation ist noch nicht geklärt. Es wäre vorstellbar, dass die Endozytose von SGLT1, die SGLT1 zur lysosomalen Degradation dirigiert, nicht nur dynaminabhängig (Veyhl et al., 2003), sondern auch RS1-abhängig ist. Beim Fehlen von RS1 steigt die SGLT1-Menge in den Enterozyten an, weil der Signalweg inhibiert ist.

Die posttranskriptionale Beeinflussung des SGLT1 durch den RS1 ist gewebespezifisch, denn sie ist an der Niere nicht gegeben. Bei Western-Blot-Analysen und immunhistologischen Nachweisen konnten an der Niere keine unterschiedlichen Protein-Expressionsmuster des Na<sup>+</sup>-abhängige D-Glukosekotransporters bei RS1-knock-out Mäusen und Wildtypmäusen festgestellt werden. Die transkriptionalen Effekte, die man an den LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen beobachten konnte, sind an der Niere der RS1-knock-out Maus nicht zu sehen. Analysen der mRNA-Expression der Plasmamembrantransporter SGLT1, OCT1 und OCT2 in der Niere zeigten keine signifikanten Veränderungen. mRNAs und Membranen sind aus Gesamtorganen präpariert worden, die Effekte treten vielleicht nur in bestimmten Zellen auftreten. Die LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen repräsentieren nur einen bestimmten Zelltyp mit den Eigenschaften aus dem S3-Segment des proximalen Tubulus der Niere. Dagegen sprechen allerdings die bisherigen Ergebnisse aus den immunhistologischen Untersuchungen.

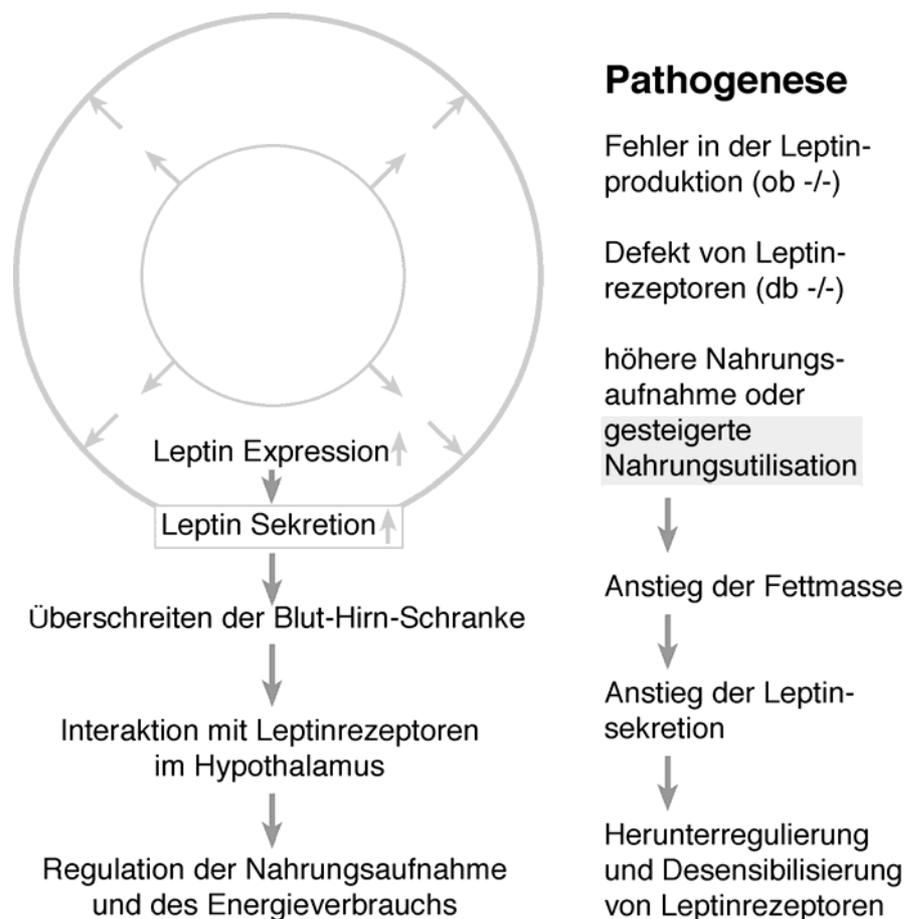
### 5.2.3 Auswirkungen auf das Fettgewebe

Es wird vermutet, dass Leptin eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Körpergewichts besitzt. Leptin ist ein Peptidhormon, das durch das ob-Gen codiert und im Fettgewebe sezerniert und exprimiert wird (Blum et al. 1997). Mäuse mit Veränderungen im ob-Gen, produzieren kein oder zu wenig Leptin. Sie sind beleibter als normale Mäuse und verlieren wieder Gewicht, wenn ihnen Leptin verabreicht wird (Pellemounter et al., 1995). Bei humaner Adipositas kommt es sehr selten zu Defekten des ob-Gens (Lönnqvist et al., 1999), es treten meist zu hohe Serumleptinspiegel und Leptinunempfindlichkeit auf (Considine et al., 1996). In diesem Fall wird Leptin sekretiert, sogar in größerer Menge als bei normalgewichtigen Menschen, der Organismus ist aber nicht fähig auf das Leptin zu reagieren. Bei dieser Art der Leptinunempfindlichkeit führt eine zusätzliche Leptinverabreichung nicht zur Gewichtsreduktion (Lönnqvist et al., 1999). Nach 24-stündigem Fasten waren bei den RS1-knock-out Mäusen erhöhte Leptinwerte im Blutserum zu finden. Die erhöhte Leptinsekretion des weißen Fettgewebes war nicht auf eine gesteigerte Leptinsynthese zurückzuführen, denn weder die mRNA-Expression noch die Protein-Expression des Leptins war in den Fettzellen gesteigert. Die Produktion von Leptin in der Fettzelle wird durch viele Faktoren beeinflusst und kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. Mittels eines Leptinrezeptors, der direkt an der Fettzelle sitzt, ist eine schnelle Beeinflussung der Leptinsezernierung gegeben (Ahima und Flier, 2000). Durch mRNA-Veränderungen ist ein Kontrolle auf Transkriptionsebene möglich (Moreno-Aliaga et al., 2001), auch im Bereich der Translation oder direkt bei der Sekretion ist ein Regulation denkbar. Eine transkriptionale oder translationale Regulation ist bei den RS1-knock-out Mäusen aufgrund der Ergebnisse ausgeschlossen. Die Leptinfreisetzung wird unter anderem durch den Glukosetransporter GLUT4 verändert. Der insulin-sensitive Plasmamembrantransporter bringt Glukose in das Innere der Adipozyten und steigert dadurch die Leptinsekretion. GLUT4 ist durch Phloretin hemmbar, gleichzeitig wird auch die Leptinsezernierung inhibiert (Teta et al., 1999; Mueller et al. 1998). Der Glukosetransporter GLUT4 untersteht aber auch der Kontrolle des Insulins, dieses Hormon erhöht die Anzahl der GLUT4 Moleküle auf der Oberfläche der Zellen und fördert damit die Glukoseaufnahme und die Leptinsekretion (James et al., 1994; Sivitz et al., 1997). Diese Regulationsmechanismen über den GLUT4 sind bei den RS1-knock-out Mäusen nicht beeinträchtigt. Die erhöhte Leptinfreisetzung des weißen Fettgewebes bei RS1-knock-out Mäusen ist also auch nicht durch einen erhöhten Einbau des Glukosetransporters GLUT 4 in die Plasmamembran bedingt. Hier stellt sich nun die Frage, ob die gesteigerte Freisetzung von Leptin eine Folge der Adipositas der RS1-knock-out Mäuse, also ein sekundärer Effekt, ist oder ob die erhöhte

Leptinfreisetzung durch das Fehlen von RS1 bedingt und somit ein primärer Effekt ist. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, muss man sich eingehend mit den verschiedenen Möglichkeiten einer Adipositasentstehung auseinandersetzen.

### 5.2.4 Entstehung einer Adipositas

Einige Mechanismen, die zur Adipositas führen können sind bekannt (Campfield and Smith, 1999). Ein Defekt des ob-Gens führt zu einem Fehler in der Produktion des Leptins (Abb. 5-1, rechts). (ob -/-)-Mäuse haben eine sehr stark ausgeprägte Obesitas, bei der durch Gabe von Leptin eine Normalisierung der Symptome möglich ist (Hamilton et al, 1995; Pellemounter et al., 1995). Ist hingegen, das db-Gen mutiert, so sind die Leptinrezeptoren defekt (Abb. 5-1, rechts). Dann zirkuliert Leptin zwar im Blut, der Hypothalamus ist aber nicht fähig darauf zu reagieren (Lee et al., 1996). Es kommt ebenfalls zu einer Adipositas.



**Abb. 5-1 Pathogene Veränderungen bei der Regulation des Energiestoffwechsels via Leptin**

Auch Störungen beim Überschreiten der Blut-Hirn-Schranke (Abb. 5-1, links) (Golden et al. 1997) und Interaktionstörungen mit Neuropeptiden, wie z.B. die ausbleibende Hemmung der Neuropeptid-Y-Synthese, das die Nahrungsmittelaufnahme anregt und die Thermogenese verringert (Stephens et al., 1995), kommen als Defektmöglichkeiten bei der Entstehung einer Fettsucht in Betracht .

Bei der Adipositas der RS1-knock-out Mäuse kann ausgeschlossen werden, dass Defekte des ob-Gens vorliegen, weil Leptin im Blut der Mäuse vorhanden ist. So kann die Adipositas der RS1-knock-out Mäuse prinzipiell auf unterschiedlichen Wegen erklärt werden. Der ersten Hypothese liegt eine gesteigerte Nahrungsutilisation durch die verbesserte Glukoseaufnahme über den SGLT1 im Darm zugrunde (Abb. 5-1, links). Die gesteigerte Glukoseabsorption wäre die Ursache für den Anstieg der Fettmasse. Die Fettzellen würden sich vergrößern und daraufhin mehr Leptin sezernieren (Ahima und Flier, 2000; Abbildung 5-1, linke Seite).

Da RS1 aber auch in den Fettzellen exprimiert wird, wäre es auch möglich, dass die primäre Ursache der Fettsucht auf einer frühen Störung der Leptinsekretion beruht. Nach dieser zweiten Hypothese könnte die gesteigerte Leptinsekretion zu einer Leptinresistenz im Hypothalamus führen (El-Haschimi et al., 2000). Durch die fehlende Regulation des Leptins könnte es zu einer erhöhten Futtermittelaufnahme kommen, die zur Adipositas führen würde, kommen (Frederich et al., 1995). Dabei wäre der SGLT1 nicht oder nur sekundär an der Ausbildung der Adipositas beteiligt. Gegen diese Hypothese spricht, dass die RS1-knock-out Mäuse weder erhöhte Futtermittelaufnahme noch reduzierten Bewegungsbedarf zeigen. Die Serumleptinspiegel sind bei den RS1-knock-out Mäusen nur geringfügig erhöht (Masuzaki et al., 1995; Lönnqvist et al., 1999), erst nach Fasten sind sie deutlich höher als die der Wildtypmäuse, die Werte stiegen aber auch dann nicht über die der gefütterten Wildtypmäuse an. Eine Desensibilisierung durch eine erhöhte Leptinausschüttung und eine daraus resultierende Fettleibigkeit ist deshalb eher unwahrscheinlich. Generell wäre aber eine direkte Beeinflussung der Leptinsekretion denkbar, da neue Daten zeigen, dass RS1 nicht nur dynaminabhängige Endozytoseprozesse stimuliert, sondern auch Exozytoseprozesse (Veyhl et al., 2003), durch die das Leptin aus den Fettzellen abgesondert wird (Mora and Pessin, 2002), beeinflusst. Diese Erklärung kann in Betracht gezogen werden, weil neue immunohistochemische Daten zeigten, dass RS1 nicht nur unter der Plasmamembran und innerhalb des Kerns, sondern auch am Trans-Golgi-Apparat nachzuweisen ist (Kroiß, unveröffentlichte Daten, 2003). Es wäre möglich, dass die Absonderung von Leptin auf einer dynaminabhängigen Freisetzung aus Vesikeln vom Golgi-Apparat, die Leptin enthalten, beruht und dieser Prozess von RS1 gehemmt wird.

Einer weiteren Hypothese liegt die Annahme einer Beeinflussung der Expression der Leptinrezeptoren durch RS1 zugrunde. Das db-Gen codiert die Rezeptoren für Leptin. Veränderungen des Mäuse-db-Gens resultieren in Korpulenz und Diabetes, ähnlich krankhafter menschlicher Adipositas. Ist ein Leptinrezeptor defekt, so unterbleibt die Leptin-vermittelte Signaltransduktion (Lee et al, 1996). Gewichtreduzierenden Effekte des Leptins, wie gesteigerter Bewegungsbedarf und erniedrigte Futteraufnahme, bleiben aus. Diese Hypothese erscheint jedoch sehr unwahrscheinlich, da weder die Futteraufnahme noch der Bewegungsbedarf der RS1-knock-out Mäuse von denen der Wildtypmäuse abwich. Außerdem wäre hier die Bedeutung des Fehlens von RS1 fraglich.

Die erste Hypothese, nach der die Fettsucht durch eine erhöhte Nahrungsmittelutilisation aufgrund der Überexpression von SGLT1 im Darm der RS1-knock-out Mäuse bedingt ist, erscheint nach derzeitigen Ergebnissen am wahrscheinlichsten. Im Allgemeinen herrscht der Glaube, dass aufgenommene D-Glukose vollständig im Darm resorbiert wird. Das gut studierte Phänomen, dass  $\text{Na}^+$ -D-Glukosetransporter und passive Glukosetransporter im Dünndarm während der Einnahme der Nahrung und in Erwiderung auf unterschiedliche Diäten hochreguliert sind (Cheeseman and Tsang, 1996; Ferraris and Diamond, 1997; Hirsh et al., 1996; Stümpel et al., 1997), lässt darauf schließen, dass Änderungen im intestinalen Glukosetransport eine wichtige physiologische Rolle spielen. Tatsächlich gibt es einige Möglichkeiten, wie die Hochregulation von SGLT1 im Darm die Nahrungsnutzung verbessern kann. Zum einen könnten die RS1-knock-out Mäuse D-Glukose oder D-Galaktose, die aus  $\alpha$ -Amylasebeständigen Kohlenhydratpolymeren freigesetzt werden, vollständiger resorbieren (Debnam et al., 1998), wenn der  $\text{Na}^+$ -D-Glukosetransporter SGLT1 im distalen Teil des Dünndarms hochreguliert ist. In diesem Fall kann D-Glukose, die passiv in das Lumen des distalen Dünndarms zurückfließt, leistungsfähiger resorbiert werden. Um diese Möglichkeiten zu prüfen, müsste die Verteilung von SGLT1 in den unterschiedlichen Dünndarmsegmenten von RS1-knock-out und Wildtypmäusen verglichen werden. Anhand von Fütterungsexperimenten mit unterschiedlichen Glukosepolymeren könnte die jeweilige Aufnahme getestet werden.

*In vivo* wird D-Glukose im Dünndarm auch bei Kontrolltieren vollständig resorbiert. Die RS1-knock-out Mäuse weisen jedoch erhöhte postprandiale Glukosekonzentrationen in der Pfortader auf, die auf der Hochregulation des SGLT1 beruhen. Es ist gezeigt worden, dass postprandiale D-Glukosekonzentrationsspitzen in der Pfortader Einfluss auf die Insulinfreisetzung besitzen. Dieses Phänomen ist als enteroinsulare Achse bekannt. Es umfasst die Freisetzung von Insulin aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas und wird hauptsächlich durch ein Glukose-abhängiges Polypeptid vermittelt. Dieses

Hormon wurde zuerst nach seinen hemmenden Eigenschaften als „gastric inhibitory Polypeptide“ (GIP) benannt. Jedoch scheint seine physiologisch relevante Rolle ein stimulierender Effekt auf Insulinfreigabe und -synthese zu sein. Dementsprechend wurde es später „glucose-dependent insulinotropic Polypeptide“ umbenannt. Seine Freigabe ist von verschiedenen Faktoren wie z. B. Glukosegehalt der Mahlzeit und Gesundheitszustand abhängig. GIP wird von den K-Zellen des Dünndarms, die durch D-Glukose aktiviert werden können, freigesetzt. (Cheeseman and Tsang, 1996; Tseng et al, 1996 ; Kieffer et al., 1994; Lardinois et al., 1999 ; Lewis et al., 2000 ; Yip and Wolfe, 2000). Zusätzlich wird während der absorptiven Phasen der Mahlzeiten die postprandiale Insulinabsonderung der  $\beta$ -Zellen des Pankreas durch parasymphatische Nerven angeregt, die vielleicht über Glukose-sensitive Neuronen im Dünndarm aktiviert werden können. (D'Alessio et al., 2001; Ferraris and Diamond, 1997; Liu et al., 1999). Da bekannt ist, dass bei „physiologischer“ Hyperglykämie die Darmmotorik und Sekretion über D-Glukosesensoren in der Pfortader Glukose-abhängig reguliert werden (Andrews et al., 1998; Rayner et al., 2001), können die postprandiale Glukosekonzentrationsspitzen in der Pfortader der RS1-knock-out Mäuse durchaus zu einer Modulation der Nahrungsaufnahme führen. Der Glukosestoffwechsel in der Leber kann ebenfalls über die Glukosekonzentration in der Pfortader gesteuert werden. Glukose- und Insulin-abhängige Gene in der Leber können stimuliert werden (Foufelle et al., 1996; Rencurel et al., 1996).

Es ist davon auszugehen, dass die RS1-knock-out Mäuse eine veränderte Nahrungsnutzung aufgrund der verbesserten Glukoseaufnahme im Dünndarm aufweisen. Die Adipositas demzufolge ein sekundärer Effekt. Gleichzeitig kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass RS1 direkt auf die Zellen des weißen Fettgewebes wirkt und bei Wildtypmäusen die Sekretion des Leptins aus Vesikeln hemmt.

## 5.4. Ausblick

Der Nachweis der physiologischen Bedeutung von RS1 ist durch die Erzeugung der RS1-knock-out Maus gelungen. Nach Ausschalten von RS1 wurde eine Hochregulation von SGLT1 beobachtet, die zu einer verstärkten Resorption von D-Glukose im Dünndarm führt. Die vermehrte Nahrungsutilisation im Dünndarm ist nach bisherigen Annahmen die Ursache für die Fettsucht der RS1-knock-out Mäuse. Es ist deshalb wichtig zu verstehen, in welcher Weise RS1 in den Enterozyten an der Regulation von SGLT1 beteiligt ist. Ziel zukünftiger Untersuchungen muss es sein, Änderungen der Regulation im Dünndarm von RS1-knock-out Mäusen zu beweisen und zu klären, ob diese tatsächlich für die Adipositas verantwortlich sind.

Durch Kreuzung von RS1-knock-out Mäusen mit induzierbaren immortalisierten Mäusen könnten immortalisierte Enterozytenzelllinien mit und ohne RS1 hergestellt werden. Die dazu verwendeten transgenen Mäusen, würden ein temperaturabhängiges SV40 Tumor Antigen (Tg) im Interferon-induzierbaren Promotor des Histokompatibilitätskomplex enthalten (Immortal-Maus). Aus dem Dünndarm einer so entstandenen transgenen RS1-knock-out Maus (RS1-KO-Immortal-Maus) könnte man eine immortalisierte Enterozytenzelllinie herstellen. Bei bestimmten immortalisierten Zelllinien kann die Differenzierung der Zellen durch Änderung der Kultivierungstemperatur von 33 °C auf 39.5 °C induziert werden. Nach ihrer Differenzierung exprimieren diese Zellen Zonulae occludentes und Na<sup>+</sup>-D-Glukosekotransportaktivität. Enterozytenzelllinien mit und ohne RS1 könnten unter differenzierenden Bedingungen in verschiedenen Zelldichten ausgesät werden. Die Zellen sollten dann so lange kultiviert werden, bis ein Teil der Zellen kurz vor Konfluenz und ein anderer konfluent ist. Dann könnte die Transportaktivität von SGLT1 in Form der durch Phlorizin hemmbaren Aufnahme von [<sup>14</sup>C]AMG gemessen werden. Falls konfluenzabhängige Unterschiede der Transportaktivität sichtbar werden, sollte untersucht werden, ob diese Unterschiede durch Veränderungen der Transkription oder Translation von SGLT1 bedingt sind oder ob die Endozytose von SGLT1 verändert ist.

Sehr interessante Ergebnisse könnte eine Kreuzung der RS1-knock-out Maus mit einer induzierbaren SGLT1-knock-out Maus bringen. Beruht die Fettsucht in den RS1-knock-out Mäusen tatsächlich auf der Hochregulation von SGLT1, dürften die gekreuzten Mäuse beim Ausschalten des SGLT1 im Darm keine Fettsucht mehr aufweisen. Damit wäre bewiesen, dass die Fettsucht auf der verbesserten Nahrungsutilisation, resultierend aus der gesteigerten Glukoseaufnahme über den SGLT1, beruht.

Mit der RS1-knock-out Maus ist ein Modell für eine Fettsucht geschaffen worden. Bedeutend für die Medizin wäre es, wenn die Wirkung des ausgeschalteten RS1 auf den Menschen übertragbar wäre, und wenn Defekte des menschlichen RS1 auch zu

einer humanen Obesitas führen würden. In weiteren Untersuchungen soll geklärt werden, ob die bei den RS1-knock-out Mäusen beobachtete Adipositas auch beim Menschen vorkommt. Dazu sollen Polymorphismen und Mutationen in hRS1 identifiziert werden, die zum Funktionsverlust von RS1 führen. Ob derartigen Mutationen beim Menschen mit Fettsucht korrelieren, ist nachzuprüfen. Es besteht mittlerweile eine Kooperation mit der Firma Epidauros in Bernried, bei der die hRS1-Gene von 100 normalgewichtigen und 100 fettsüchtigen Personen sequenziert werden. Gefundene Mutationen von hRS1 können dann weiter analysiert werden.

Korpulenz oder Fettleibigkeit stellen in vielen Nationen bedeutende Gesundheitsprobleme dar. In der Regel mangelt es an wirkungsvollen Behandlungsmöglichkeiten der Fettleibigkeit. Wenn der Adipositas jedoch ein genetischer Defekt des RS1 zugrunde liegt, könnte hier ein neuer Ansatzpunkt zur Behandlung gefunden werden.

## 6.Literaturverzeichnis

**Ahima R.S. and Flier J.S.**, 2000, Review: Leptin, *Annu Rev Physiol.*, **62**:413-437

**Akimjanova M., Kühlkamp T., Kroiß M., Baumgarten K., Müller T., Gorboulev V., Koepsell H.**, 2002, RS1 is an ubiquitin binding protein below the plasma membrane that migrates into the nucleus and suppresses transcription of SGLT1, *eingereicht*

**Amsler K., Ghatani S., Hemmings B.A.**, 1991, cAMP-dependent protein kinase regulates renal epithelial cell properties, *Am J Physiol*, **260(6 Pt 1)**:C1290-1299

**Andrews J. M., Rayner C. K., Doran S., Hebbard G. S., Horowitz M.**, 1998, Physiological changes in blood glucose affect appetite and pyloric motility during intraduodenal lipid infusion, *Am. J Physiol*, **275**:G797-G804

**Asano T., Shibasaki Y., Lin J.L., Akanuma Y., Takaku F., Oka Y.**, 1989, The nucleotide sequence of cDNA for a mouse liver-type glucose transporter protein. *Nucleic Acids Res.*, **17(15)**:6386

**Arrizabalaga P., Mirapeix E., Darnell A., Torras A., Revert L.**, 1989, Cellular immunity analysis using monoclonal antibodies in humanglomerulonephritis, *Nephron.*; **53(1)**:41-49

**Bachg D., Reinauer H.**, 1995, The economic glucose analyzer – results of evaluation, *Lab. Med*, **19**: 463-466

**Banauch D., Brummer W., Ebeling W., Metz H., Rindfrey H., Lang H., Leybold K., Rick W., Staudinger H.J.**, 1975, Eine Glukose Dehydrogenase für die glukose-Bestimmung in Körperflüssigkeiten, *Z Klin Chem Klin Biochem*, **13(3)**:101-107

**Baumgarten K.**, 1999, Untersuchungen zu RS1, einem Regulator von Plasmamembrantransportern, *Dissertation, Universität Würzburg*

**Behrens J., von Kries J.P., Kuhl M., Bruhn L., Wedlich D.**, 1996, Grosschedl R., Birchmeier W., Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1, *Nature*, **382(6592)**:638-642

**Bell G.I., Burant C.F., Takeda J., Gould G.W.**, 1993, Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters, *J Biol Chem*, **268**,19161-19164

**Birnboim H.C., Doly J.**, 1979, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7(6)**:1513-1523

**Blum W.F., Englaro P., Hanitsch S., Juul A., Hertel N.T., Muller J., Skakkebaek N.E., Heiman M.L., Birkett M., Attanasio A.M., Kiess W., Rascher W.**, 1997, Plasma leptin levels in healthy children and adolescents: dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage, and testosterone, *J Clin Endocrinol Metab*, **82(9)**:2904-2910

- Bradford M.M.**, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.* **72**:248-254
- Brown M.S., Goldstein J.L.**, 1997, Review: The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by of a membrane-bound transcription factor, *Cell*, **89(3)**:331-340
- Buchberger A.**, 2002, Review: From UBA to UBX: new words in the ubiquitin vocabulary, *Trends Cell Biol.*, **12(5)**:216-221
- Campfield L.A., Smith F.J.**, 1999, Review: The pathogenesis of obesity, *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **13(1)**:13-30
- Catty D. Raykundalia C.**, 1989, ELISA and related enzyme immunoassays, p **97-154**, In Catty D. (ed.), *Antibodies, A practical approach*, 1<sup>st</sup> ed. IRL Press, Oxford
- Charron M.J., Katz E.B.**, 1998, Review: Metabolic and therapeutic lessons from genetic manipulation of GLUT4, *Mol Cell Biochem*, **182(1-2)**:143-152
- Chehab F.F., and LimM.E.**, 1995, Genomic organization and sequence of the mouse obesity gene, Unpublished
- Chen J.J., Li Z., Pan H., Murphy D.L., Tamir H., Koepsell H., Gershon M.D.**, 2001, Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: Abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters, *J Neurosci*, **21(16)**:6348-6361
- Cheeseman C.I.**, 1993, GLUT2 is the transporter for fructose across the rat intestinal basolateral membrane, *Gastroenterology*, **105(4)**:1050-1056
- Cheeseman C.I.**, 1997, Upregulation of SGLT-1 transport activity in rat jejunum induced by GLP-2 infusion in vivo, *Am J Physiol*, **273(6 Pt 2)**:R1965-1971
- Cheeseman, C. I. and Tsang R.** 1996, The effect of GIP and glucagon-like peptides on intestinal basolateral membrane hexose transport, *Am.J Physiol* **271**:G477-G482
- Chomczynski P., Sacchi N.**, 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem*, **162(1)**:156-159
- Considine R.V., Sinha M.K., Heiman M.L., Kriauciunas A., Stephens T.W., Nyce M.R., Ohannesian J.P., Marco C.C., McKee L.J., Bauer T.L., et al.**, 1996 , Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans, *N Engl J Med*, **334(5)**:292-295
- D'Alessio, D. A., Kieffer T. J., Taborsky,G. J. jr., Havel P. J.**, 2001, Activation of the parasympathetic nervous system is necessary for normal meal-Induced Insulin Secretion in rhesus macaques, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **86**:1253-1259
- Debnam E.S., Denholm E.E., Grimble G.K.**, 1998, Acute and chronic exposure of rat intestinal mucosa to dextran promotes SGLT1-mediated glucose transport, *Eur J Clin Inves*, **28(8)**:651-8

- De La Horra M.C., Cano M., Peral M.J., Calonge M.L., Ilundain A.A.**, 2001, Hormonal regulation of chicken intestinal NHE and SGLT-1 activities, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **280(3)**:R655-60
- De Vos A., Heimberg E., Quartier E., Huypens P., Bouwens L., Pipeleers D., Schuit F.**, 1995, Human and rat beta cells differ in glucose transporter not in glucokinase gene expression, *J. Clin. Invest.*, **96**:2489-2495
- Dieckmann T., Withers-Ward E.S., Jarosinski M.A., Liu C.F., Chen I.S., Feigon J.**, 1998, Structure of a human DNA repair protein UBA domain that interacts with HIV-1 Vpr, *Nat Struct Biol*, **5(12)**:1042-1047
- Domen P.L., Nevens J.R., Mallia A.K., Hermanson G.T., Klenk D.C.**, 1990, Site-directed immobilization of proteins, *J Chromatogr*, **510**:293-302
- Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W.**, 1988 High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation, *Nucleic Acids Res*, **16(13)**:6127-6145
- Dyer J., Barker P.J., Shirazi-Beechey S.P.**, 1997, Nutrient regulation of the intestinal Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter (SGLT1) gene expression, *Biochem Biophys Res Commun.*, **230(3)**:624-629
- EI-Haschimi K., Pierroz D.D., Hileman S.M., Bjorbaek C., Flier J.S.**, 2000, Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest.*, **105(12)**:1827-1832
- Elrick R.H., Parker R.P.**, The use of Cerenkov radiation in the measurement of beta-emitting radionuclides, 1968, *Int J Appl Radiat Iso*, **19(3)**:263-271
- Farrell, C. R., Boado, R. J., and Pardridge, W. M.**, 1992, Enhanced GLUT1 glucose transporter and cytoskeleton gene expression in cultured bovine brain capillary endothelial cells after treatment with phorbol esters and serum, *Mol. Brain Res.* **15**, 221–226
- Ferraris, R. P., Diamond, J.M.**, 1998, Review: Specific regulation of intestinal nutrient transporters by their dietary substrates, *Annu Rev Physiol*, **51**:125-41
- Ferraris, R. P., Diamond, J.M.**, 1997, Regulation of intestinal sugar transport, *Physiol Rev*, **77**:257-302
- Ferraris, R. P., Diamond, J.M.**, 1993, Crypt/villus site of substrat-dependent regulation of mouse intestinal glucose transport, *Am. J. Physiol.*, **77**:257-302
- Foufelle F., Girard J., Ferre P.**, 1996, Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipose tissue: a review of the potential cellular and molecular mechanisms, *Adv Enzyme Regul.*; **36**:199-226
- Frederich R.C., Hamann A., Anderson S., Lollmann B., Lowell B.B., Flier J.S.**, 1995, Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action, *Nat Med*, **1**, 1311-1314
- Geering K., Theulaz I., Verrey F., Hauptle M.T., Rossier B.C.**, 1989, A role for the beta-subunit in the expression of functional Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in *Xenopus* oocytes, *Am J Physiol*, **257(5 Pt 1)**:C851-858

- Gilbert W., Maxam A.**, 1973, The nucleotide sequence of the lac operator, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **70(12)**:3581-3584
- Golden P.L., Maccagnan T.J., Pardridge W.M.**, 1997, Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels. *J Clin Invest.*, **99(1)**:14-18
- Gorboulev V., Ulzheimer J.C., Akhoundova A., Ulzheimer-Teuber I., Karbach U., Quester S., Baumann C., Lang F., Busch A.E., Koepsell H.**, 1997, Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters DNA, *Cell Biol.*, **16(7)**:871-881
- Gould G. W., Holman G. D.**, 1993, The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression, *Biochem. J.*, **295**:329-341
- Grant S.G., Jessee J., Bloom F.R., Hanahan D.**, 1990, Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87(12)**:4645-4649
- Gross-Bellard M., Oudet P., Chambon P.**, 1973, Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells, *Eur J Biochem*, **36(1)**:32-38
- Gründemann D., Koepsell H.**, 1994, Ethidium bromide staining during denaturation with glyoxal for sensitive detection of RNA in agarose gel electrophoresis, *Anal Biochem*, **216(2)**:459-461
- Halaas J.L., Gajiwala K.S., Maffei M., Cohen S.L., Chait B.T., Rabinowitz D., Lallone R.L., Burley S.K., Friedman J.M.**, 1995, Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene, *Science*, **269(5223)**:543-546
- Hamilton B.S., Paglia D., Kwan A.Y., Deitel M.**, 1995, Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans, *Nat Med.*, **1(9)**:953-956
- Harlow E., Lane D.**, 1988, Immunoaffinity purification of antibodies on an antigen column, **p312- 315**, In Harlow E., Lane D. (ed) , *Antibodies, A laboratory manual*, 1<sup>st</sup> ed., Cold Harbor Laboratory, New York
- Hediger, M., Rhoads, D. B.**, 1994, Molecular Physiology of Sodium-Glucose Co-transporters, *Physiological Reviews*, **74 (4)**:993-1026,
- Hirsch J.R., Loo D.D.F., Wright E.M.**, 1996, Regulation of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter expression by protein kinases in *Xenopus laevis* oocytes, *J Biol Chem* **271**,14740-14746
- Hirsh A.J., Cheeseman C.I.**, 1998, Cholecystokinin decreases intestinal hexose absorption by a parallel reduction in SGLT1 abundance in the brush-border membrane, *J Biol Chem*, **273(23)**:14545-14549
- Hirsh, A. J., Tsang R., Kammila S., and Cheeseman C. I.**, 1996, Effect of cholecystokinin and related peptides on jejunal transepithelial hexose transport in the Sprague-Dawley rat, *Am.J Physiol*, **271**:G755-G761

- Ishikawa Y., Eguchi T, Ishida H.**, 1997, Mechanism of beta-adrenergic agonist-induced transmural transport of glucose in rat small intestine. Regulation of phosphorylation of SGLT1 controls the function, *Biochim Biophys Acta*, **1357(3)**:306-318
- James D.E., Piper R.C., Slot J.W.**, 1994, Insulin stimulation of GLUT-4 translocation: a model for regulated recycling. *Trends in Cell Biology*, **4**, 120-126
- James D.E., Piper R.C.**, 1994, Insulin resistance, diabetes, and the insulin-regulated trafficking of GLUT-4, Review, *J Cell Biol.*, **126(5)**:1123-1126
- Jonker J.W., Wagenaar E., Mol C.A., Buitelaar M., Koepsell H., Smit J.W., Schinkel A.H.**, 2001, Reduced hepatic uptake and intestinal excretion of organic cations in mice with a targeted disruption of the organic cation transporter 1 (Oct1 [Slc22a1]) gene, *Mol Cell Biol*, **21(16)**:5471-5477
- Kaestner K.H., Christy R.J., McLenithan J.C., Braiterman L.T., Cornelius P., Pekala P.H., Lane M.D.**, 1989, Sequence, tissue distribution, and differential expression of mRNA for a putative insulin-responsive glucose transporter in mouse 3T3-L1 adipocytes, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **86(9)**:3150-4.
- Kahn B.B., Flier J.S.**, 2000, Review: Obesity and insulin resistance, *J Clin Invest*, **106(4)**:473-481
- Kappel C.A., Bieberich C.J, Jay G.**, 1994, Review: Evolving concepts in molecular pathology, *FASEB J.*, **8(9)**:583-592
- Karbach U., Kricke J., Meyer-Wentrup F., Gorboulev V., Volk C., Loffing-Cueni D., Kaissling B., Bachmann S., Koepsell H.**, 2000, Localization of organic cation transporters OCT1 and OCT2 in rat kidney, *Am J Physiol Renal Physiol*, **279(4)**:F679-87
- Kawasaki E.S., Clark S.S., Coyne M.Y., Smith S.D., Champlin R., Witte O.N., McCormick F.P.**, 1988 Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85(15)**:5698-56702
- Kieffer, T. J., Buchan A. M., Barker H., Brown J. C., Pederson R. A.**, 1994, Release of gastric inhibitory polypeptide from cultured canine endocrine cells, *Am J Physiol*, **267**:E489-E496
- Kim M., Cooke H.J., Javed N.H., Carey H.V., Christofi F., Raybould H.E.**, 2001, D-glucose releases 5-hydroxytryptamine from human BON cells as a model of enterochromaffin cells, *Gastroenterology*, **121**: 1400-1406
- Kimmich G.A., Randles J., Wilson J.**, 1994, Na(+)-coupled alanine transport in LLC-PK1 cells, *Am J Physiol.*, **267(4 Pt 1)**:C1119-1129
- Kong, C.T., S.F. Yet, J.E. Lever**, 1993, Cloning and expression of a mammalian Na<sup>+</sup>-aminoacid cotransporter with sequence similarity to Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters, *J. Biol. Chem.*, **268**:1509-1512
- Kowit J.D., Maloney J.**, 1982, Protein cleavage by boiling in sodium dodecyl sulfate prior to electrophoresis, *Anal Biochem.*, **123(1)**:86-93

- Klip A., Tsakiridis T., Marette A., Ortiz P.A.**, 1994, Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures, *FASEB*, **8**,43-53
- Koepsell H., Seibicke S.**, 1990, Reconstitution and fractionation of renal brush border transport proteins, *Methods Enzymol*, **191**:583-605
- Koepsell, H., Spangenberg, J.**, 1994, Function and Presumed Molecular Structure of Na<sup>+</sup>-D-Glucose Cotransport Systems, *J. Membrane Biol.*, **138**:1-11
- Kojima T., Nishimura M., Yajima T., Kuwata T., Suzuki Y., Goda T., Takase S., Harada E.**, 1999, Developmental changes in the regional Na<sup>+</sup>/glucose transporter mRNA along the small intestine of suckling rats, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, **122(1)**:89-95
- Korn T.**, 1999, Ein neues Regulationsprinzip von Plasmamembrantransportern in der Schweinenierenepithelzelllinie LLC-PK<sub>1</sub> unter besonderer Berücksichtigung des Na<sup>+</sup>/Glukose Cotransporters SGLT1, *Dissertation, Universität Würzburg*
- Korn T., Kühlkamp T., Track C., Schatz I., Baumgarten K., Gorboulev V., Koepsell H.**, 2001, The plasma membrane-associated protein RS1 decreases transcription of the transporter SGLT1 in confluent LLC-PK<sub>1</sub> cells, *J Biol Chem*, **276**, 45330-45340
- Kühlkamp T.**, 2001, Der plasmamembranassoziierte Transportregulator RS1 bindet Ubiquitin und gelangt in den Zellkern, *Dissertation, Universität Würzburg*
- Kurokawa T., Hashida F., Kawabata S., Ishibashi S.**, 1995, Evidence for the regulation of small intestinal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter by insulin, *Biochem Mol Biol Int.*, **37(1)**:33-38
- Kyhse-Andersen J.**, Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J Biochem Biophys Methods*, **10(3-4)**:203-209
- Laemmli U.K.**, 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227(259)**:680-685
- Lambotte S., Veyhl M., Köhler M., Morrison-Shetlar A. I., Kinne R. K.-H., Schmid M., Koepsell H.**, 1996, The Human Gene of a Protein That Modifies Na<sup>+</sup>-D-Glucose Co-Transport, *DNA and Cell Biology*, **15**:769-777
- Lardinois, C. K., Richeson R. B., Starich G. H., Mazzu D., . Mazzaferri E. L.**, 1990, Gastric inhibitory polypeptide mechanisms of augmenting insulin secretion. *Life Sci* **47**:1015-1022
- Lee G.H., Proenca R., Montez J.M., Carroll K.M., Darvishzadeh J.G., Lee J.I., Friedman J.M.**, 1996, Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice, *Nature* **379**: 632-635
- Lee W.S., Kanai Y., Wells R.G., Hediger M.A.**, 1994, The high affinity Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. Re-evaluation of function and distribution of expression, *J Biol Chem*, **269(16)**:12032-12039
- Lee W.Y., Loflin P., Clancey C.J., Peng H., Lever J.E.**, 2000, Cyclic nucleotide regulation of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1) mRNA stability. Interaction of a

nucleocytoplasmic protein with a regulatory domain in the 3'-untranslated region critical for stabilization, *J Biol Chem*, **275(43)**:33998-34008

**Lescale-Matys, L., Dyer, J., Scott, D., Freeman, T. C., Wright, E. M., Shirazi-Beechey, S. P.**, 1993, Regulation of the ovine intestinal Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter (SGLT1) is dissociated from mRNA abundance, *Biochem. J.*, **291**:435-440

**Lewis J. T., Dayanandan B., Habener J. F., Kieffer T. J.**, 2000, Glucose-dependent insulinotropic polypeptide confers early phase insulin release to oral glucose in rats: demonstration by a receptor antagonist, *Endocrinology*, **141**:3710-3716

**Liu M., Seino S., Kirchgessner A. L.**, 1999, Identification and characterization of glucoreponsive neurons in the enteric nervous system, *J Neurosci.*, **19**:10305-10317

**Loflin P., Lever J. E.**, 2001, HuR binds a cyclic nucleotide-dependent, stabilizing domain in the 3' untranslated region of Na(+)/glucose cotransporter (SGLT1) mRNA, *FEBS Lett.*, **509**:267-271

**Lönnqvist, F., Nordfors L., and Schalling M.**, 1999, Leptin and its potential role in human obesity, *J Intern.Med.*, **245**:643-652

**MacDougald O. A., Hwang C. S., Fan H., and Lane M. D.**, 1995, Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes, *Proc.Natl.Acad.Sci USA*, **92**:9034-9037

**Martin M.G., Wang J., Solorzano-Vargas R.S., Lam J.T., Turk E., Wright E.M.**, 2000, Regulation of the human Na(+)-glucose cotransporter gene, SGLT1, by HNF-1 and Sp1, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **278(4)**:G591-603

**Masuzaki, H., Y. Ogawa, N. Isse, N. Satoh, T. Okazaki, M. Shigemoto, K. Mori, N. Tamura, K. Hosoda, Y. Yoshimasa**, 1995, Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue, *Diabetes* **44**:855-858

**Mooslehner K.A., Allen N.D.**, 1999, Cloning of the mouse organic cation transporter 2 gene, Slc22a2, from an enhancer-trap transgene integration locus, *Mamm Genome*, **10(3)**:218-224

**Mora S., Pessin J.E.**, 2002, An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking, *Diabetes Metab Res Rev.*, **18(5)**:345-356

**Moreno-Aliaga M.J., Stanhope K.L., Havel P.J.**, 2001, Transcriptional regulation of the leptin promoter by insulin-stimulated glucose metabolism in 3t3-l1 adipocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, **283(3)**:544-548

**Mueckler M., Caruso C., Baldwin S.A., Panico M., Blench I., Morris H.R.**, 1985, Allard W.J., Lienhard G.E., Lodish H.F., Sequence and structure of a human glucose transporter, *Science*, **229(4717)**:941-945

**Mueller W.M., Gregoire F.M., Stanhope K.L., Mobbs C.V., Mizuno T.M., Warden C.H., Stern J.S., Havel P.J.**, 1998, Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes, *Endocrinology*, **139(2)**:551-558

- Mullin J.M., Weibel J., Diamond L., Kleinzeller A.**, 1980, Sugar transport in the LLC-PK<sub>1</sub> renal epithelial cell line: similarity to mammalian kidney and the influence of cell density, *J Cell Physiol.*, **104(3)**:375-89
- Ohta, T., Isselbacher, K. J., Rhoads, D. B.**, 1990, Regulation of Glucose Transportes in LLC-PK<sub>1</sub> Cells: Effects of D-Glucose and Monosaccharides, *Mol. Cell. Biol.*, **10**:6491-6499
- Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E., Trumbauer M.E., Rosenfeld M.G., Birnberg N.C., Evans R.M.**, 1982, Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes, *Nature*, **300(5893)**:611-615
- Pelleymounter M.A., Cullen M.J., Baker M.B., 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(5223)**:540-543
- Peng H., Lever J.E.**, 1995, Regulation of Na(+)-coupled glucose transport in LLC-PK1 cells. Message stabilization induced by cyclic AMP elevation is accompanied by binding of a M(r) = 48,000 protein to a uridine-rich domain in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem*, **270(41)**:23996-24003
- Peng H., Lever J.E.**, 1995, Posttranscriptional regulation of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1) gene expression in LLC-PK1 cells. Increased message stability after cyclic AMP elevation or differentiation inducer treatment, *J Biol Chem*, **270(35)**:20536-20542
- Pessin J.E., Bell G.I.**, 1992, Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation, *Annu Rev Physiol*, **54**,911-930
- Poppe, R., Karch, U., Gambaryan, S., Wiesinger, H., Lutzenburg, M., Kraemer, M., Witte, O. W., Koepsell, H.**, 1997, Expression of Na<sup>+</sup>-D-Glucose Cotransporter SGLT1 in Neurons, *J. Neurochem.*, **69**:84-94
- Rayner C. K., Samsom M., Jones K. L., Horowitz M.**, 2001, Relationships of upper gastrointestinal motor and sensory function with glycemic control, *Diabetes Care* **24**:371-381
- Reed K.C., Mann D.A.**, 1985, Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes, *Nucleic Acids Res*, **13(20)**:7207-7221
- Reinhardt J., Veyhl M., Wagner K., Gambaryan S., Dekel C., Akhoundova A., Korn T., Koepsell H.**, 1999, Cloning and characterization of the transport modifier RS1 from rabbit which was previously assumed to be specific for Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransport, *Biochim Biophys Acta*, **1417(1)**:131-143
- Rencurel F., Waeber G., Antoine B., Rocchiccioli F., Maulard P., Girard J., Leturque A.**, 1996, Requirement of glucose metabolism for regulation of glucose transporter type 2 (GLUT2) gene expression in liver, *Biochem J.*, **314 ( Pt 3)**:903-909
- Rhoads D.B., Rosenbaum D.H., Unsal H., Isselbacher K.J., Levitsky L.L.**, 1998, Circadian periodicity of intestinal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter 1 mRNA levels is transcriptionally regulated, *J Biol Chem.*, **273(16)**:9510-9516

- Rickwood D.**, 1984, Centrifugation, A practical approach, 2<sup>nd</sup> ed. IRL Press, Oxford
- Rolland F., Winderickx J., Thevelein J.M.**, 2001, Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells, *Trends Biochem. Sci.* **26**, 310-317
- Rubin G.M., Spradling A.C.**, 1982, Genetic transformation of Drosophila with transposable element vectors, *Science*, **218(4570)**:348-353
- Sadot E., Simcha I., Shtutman M., Ben-Ze'ev A., Geiger B.**, 1998, Inhibition of beta-catenin-mediated transactivation by cadherin derivatives, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95(26)**:15339-15344
- Schmitt B. M., Koepsell H.**, 2002, An improved method for real-time monitoring of membrane capacitance in *Xenopus laevis* oocytes, *Biophys J*, **83**: 1345-1357.
- Schweifer N., Barlow D.P.**, 1996, The Lx1 gene maps to mouse chromosome 17 and codes for a protein that is homologous to glucose and polyspecific transmembrane transporters, *Mamm Genome*, **7(10)**:735-740
- Shioda T., Ohta T., Isselbacher K.J., Rhoads D.B.**, 1994, Differentiation-dependent expression of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter (SGLT1) in LLC-PK1 cells: role of protein kinase C activation and ongoing transcription. *Natl Acad Sci U S A*, **91(25)**:11919-11923
- Shirazi-Beechey S.P., Hirayama B.A., Wang Y., Scott D., Smith E.M., Wright E.M.**, 1991, Ontogenetic development of lamb intestinal sodium-glucose co-transporter is regulated by diet, *J Physiol*, **437**,699-708
- Sivitz W.I., Walsh S.A., Morgan D.A., Thomas M.J., Haynes W.G.**, 1997, Effects of leptin on insulin sensitivity in normal rats, *Endocrinology*, **138(8)**:3395-3401
- Slot J.W., Geuze H.J., Gigengack S., James D.E., Lienhard G.E.**, 1991, Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88(17)**:7815-7819
- Stephens T.W., Basinski M., Bristow P.K., Bue-Valleskey J.M., Burgett S.G., Craft L., Hale J., Hoffmann J., Hsiung H.M, Kriauciunas A., et al.**, 1995, The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product, *Nature*, **377(6549)**:530-532
- Stümpel F., Kucera T., Gardemann A., Jungermann K.**, 1996, Acute increase by portal insulin in intestinal glucose absorption hepatoenteral nerves in the rat, *Gastroenterology*, **110(6)**:1863-1869
- Stümpel F., Schlotka B., Jungermann K.**, 1997, A new role for enteric glucagon-37: acute stimulation of glucose absorption in rat small intestine. *FEBS Lett*, **410**:515-519
- Suzuki T., Fujikura K., Takata K.**, 1996, Na<sup>(+)</sup>-dependent glucose transporter SGLT1 is localized in the apical plasma membrane upon completion of tight junction formation in MDCK cells, *Histochem Cell Biol*, **106(6)**:529-533

- Takata K., Kasahara T., Kasahara M., Ezaki O, Hirano H.,** 1992 Immunohistochemical localization of Na(+)-dependent glucose transporter in rat jejunum, *Cell Tissue Res.*, **267(1)**:3-9
- Tanaka, T., Kishi, K., Igawa, M., Takase, S., and Goda, T.,** 1998, Dietary carbohydrates enhance lactase/phlorizin hydrolase gene expression at a transcription level in rat jejunum, *Biochem. J.*, **331 (Pt 1)**, 225–230
- Tavakkolizadeh A., Berger U.V., Shen K.R., Levitsky L.L., Zinner M.J., Hediger M.A., Ashley S.W., Whang E.E., Rhoads D.B.,** 2000, Diurnal rhythmicity in intestinal SGLT-1 function, V(max), and mRNA expression topography, *Am J Physiol Gastro-intest Liver Physiol.*, **280(2)**:G209-215
- Teta D., Bevington A., Brown J., Throssell D., Harris K.P., Walls J.,**1999, Effects of acidosis on leptin secretion from 3T3-L1 adipocytes and on serum leptin in the uraemic rat, *Clin Sci (Lond)*, **97(3)**:363-368
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J.,** 1992, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Biotechnology*, **24**:145-149
- Tseng C. C., Kieffer T. J., Jarboe L. A., Usdin T. B., Wolfe M. M.,** 1996, Postprandial stimulation of insulin release by glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP). Effect of a specific glucose- dependent insulinotropic polypeptide receptor antagonist in the rat, *J Clin Invest* , **98**:2440-2445
- Tybulewicz V.L., Crawford C.E., Jackson P.K., Bronson R.T., Mulligan R.C.,** 1991, Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene, *Cell*, **65(7)**:1153-63
- Valentin M.,** 1998, Untersuchung zur Funktion des Na<sup>+</sup>-Glukose Kotransporters SGLT1: Lokalisation in der Leber und Charakterisierung des regulierenden Proteins RS, *Dissertation, Universität Würzburg*
- Valentin M., Kühlkamp T., Wagner K., Krohne G., Arndt P., Baumgarten K., Weber W., Segal A., Veyhl M., Koepsell H.,** 2000, The transport modifier RS1 is localized at the inner side of the plasmamembrane and changes membrane, *Biochim Biophys Acta*, **1468(1-2)**:367-80
- Vayro S., Wood I.S., Dyer J., Shirazi-Beechey S.P.,** 2001, Transcriptional regulation of the ovine intestinal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SGLT1 gene. Role of HNF-1 in glucose activation of promoter function, *Eur J Biochem*, **268(20)**:5460-5470
- Veyhl M., Spangenberg J., Püschel B., Poppe R., Dekel C., Fritzsche G., Haase W., Koepsell H.,** 1993, Cloning of a membrane-associated protein which modifies activity and properties of the Na(+)-D-glucose cotransporter, *J Biol Chem*, **268(33)**:25041-25053
- Veyhl M., Wagner C.A., Gorboulev V., Schmitt B.M., Lang F., Koepsell H.,** 2003, Protein RS1 (*RSC1A1*) down-regulates the Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter SGLT1 by a posttranscriptional process that requires dynamin and is modulated by protein kinase C, submitted to Journal of Membran Biology

- Wang T., Giebisch G.**, 1998, Review: Tubule function in transgenic mice, *Exp Nephrol*, **6(5)**:447-453
- Wellhoener P., Fruehwald-Schultes B., Kern W., Dantz D., Kerner W., Born J., Fehm H. L., and Peters A.**, 2000, Glucose metabolism rather than insulin is a main determinant of leptin secretion in humans, *J Clin Endocrinol Metab* **85**:1267-1271
- Whiting P.J., Vincent A., Schlupe M., Newsom-Davis J.**, 1986, Monoclonal antibodies that distinguish between normal and denervated human acetylcholine receptor, *J Neuroimmunol.*, **11(3)**:223-35
- Wood I.S., Allison G.G., Shirazi-Beechey S.P.**, 1999, Isolation and characterization of a genomic region upstream from the Na<sup>+</sup>/d-glucose cotransporter (SGLT1) cDNA, *Biochem Biophys Res Commun*, **257(2)**:533-537
- Yet, S., Kong, C., Peng, H., Lever, J.**, 1994, Regulation of Na<sup>+</sup>/Glucose Cotransporter (SGLT1) mRNA in LLC-PK<sub>1</sub> Cells *J. Cell. Physiol.*, **158**:506-512
- Yip R.G., Wolfe M.M.**, 2000, Review: GIP biology and fat metabolism, *Life Sci.*, **66(2)**:91-103
- Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M.**, 1994, Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature*, **372(6505)**:425-432

## 7 Anhang

Die zunächst im Anhang aufgeführten Daten beinhalten Versuche, die im Zusammenhang mit der Aufklärung der Funktion und der Wirkungsweise des RS1 Proteins stehen. Die hier beschriebenen Daten wurden nicht durch Experimente an der RS1-knock-out Maus erzielt, sondern durch Untersuchungen an LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen.

### 7.1 Transkriptions-Untersuchung an LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen

Analysen an LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen wurden in Anschluss an die Doktorarbeit von Dr. Thomas Korn, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg, durchgeführt. Im Mittelpunkt seiner Untersuchungen stand die Charakterisierung einer LLC-PK<sub>1</sub>-Zelllinie, in der RS1 durch stabil transkribierte antisense RS1-mRNA funktionell ausgeschaltet war. Im Gegensatz zu den Ergebnissen, die mit der RS1-knock-out Maus erzielt werden konnten, wurden bei RS1-antisense LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen Veränderungen der mRNA-Expression festgestellt. In Northern-Blot-Hybridisierungen war im Vergleich zu den mit dem Leervektor transfizierten LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen ein deutlicher Anstieg der SGLT1-mRNA und ein leichter Anstieg der OCT2- und der GLUT1-mRNA zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu blieb die mRNA-Menge des Vasopressinrezeptors und intrazellulärer Proteine wie Ubiquitin, GAPDH und des ribosomalen Proteins S9 unverändert.

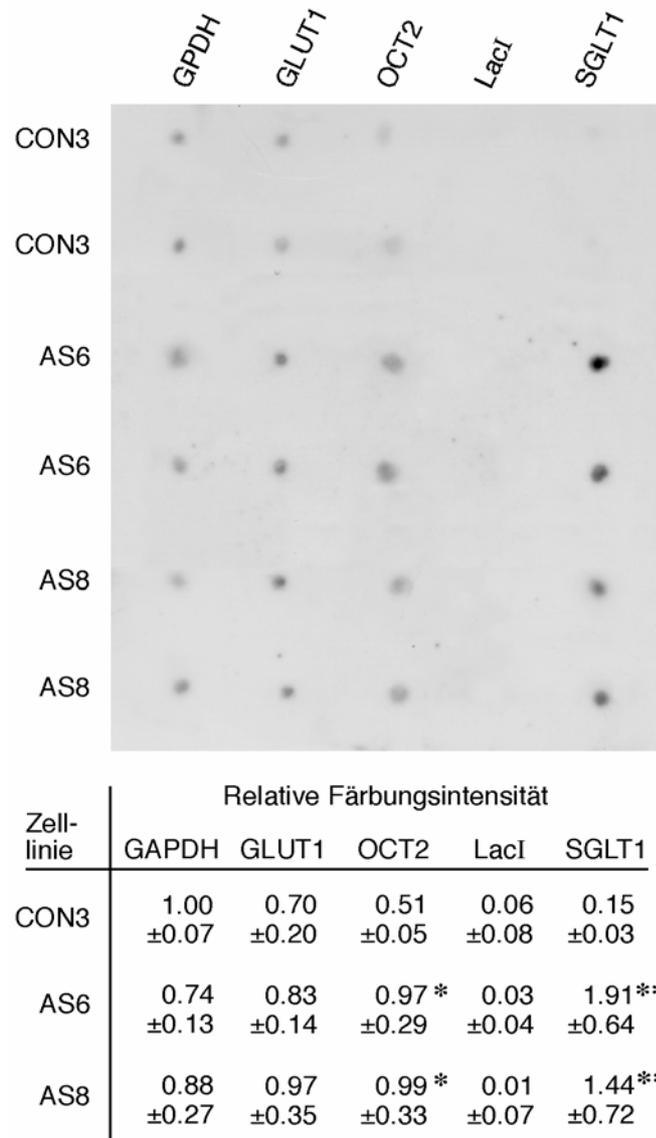
Nun stellte sich die Frage, ob die Transkriptionsrate oder die Stabilität der mRNA für die detektierten Unterschiede verantwortlich ist. Ein Experiment, in dem der Abbau der SGLT1-mRNA nach Gabe von DRB, das die RNA-Polymerase II hemmt, wurde von Dr. Thomas Korn durchgeführt und deckte keinen Unterschied zwischen  $\alpha$ RS1-Zellen und Kontrollzellen auf. Das macht eine RNA-destabilisierende Funktion von RS1 sehr unwahrscheinlich. Vermutlich beeinflusst RS1 direkt oder indirekt die Transkriptionsrate von Plasmamembrantransportern.

Mit Hilfe eines Run-off Assays wurde in dieser Arbeit die Transkription der oben genannten Transporter untersucht.

#### 7.1.1 Run-off Transkriptions-Assay

Für dieses Experiment wurden die Kontrollzelllinie CON3 und die RS1-antisense Zelllinien AS6 und AS8 mit 5 mM Glukose angezogen und 5 Tage nach Konfluenz geerntet. Nach 30minütiger Inkubation der Kerne mit radioaktiv markiertem  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dUTP wurde die neu synthetisierte mRNA isoliert. Membrangebundene c-DNA-Fragmente der Transporter hGLUT1, hSGLT1, hOCT2, der Beladungskontrolle

hGAPDH und des Lac repressors aus *E.coli* als Kontrolle für unspezifische Bindungen wurden mit der radioaktiv markierten mRNA hybridisiert (3.3.5).



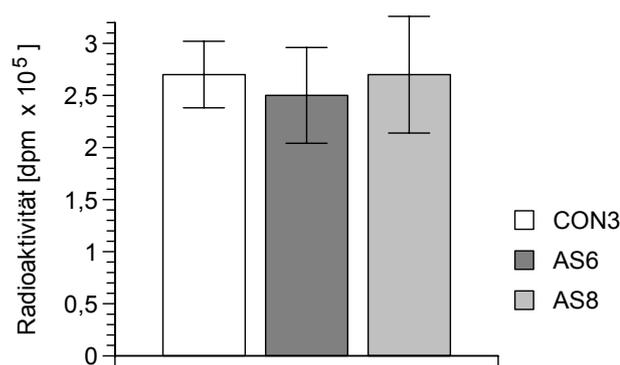
**Abb. 7-1 Nuklearer Run-off Assay in RS1 antisense LLC-PK1 Zellen**

LLC-PK<sub>1</sub> Zellen wurden mit einem pRcCMV-Vektor (CON3) beziehungsweise mit einem pRcCMV-Vektor, der antisense-RS1 enthielt (AS6 und AS8) stabil transfiziert. Diese Zellen wurden in Gegenwart von 5 mM Glukose angezogen und 5 Tage nach Konfluenz geerntet. Die Kerne wurden isoliert und mit ATP, GTP, CTP und [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP 30 min inkubiert. Danach wurden mRNAs isoliert. Um gereinigte cDNA Fragmente von hGAPDH, hGLUT1, hOCT2, LacI und pSGLT1, die auf einer Nylonmembran immobilisiert waren, zu hybridisieren wurden gleiche Mengen der radioaktiven mRNAs verwendet. Das obere Bild zeigt die Autoradiographie eines Experiments. Die Anfärbungen dieses und eines weiteren unabhängigen Experiments (vier Dots für jedes Gen und jede Zelllinie) wurden densitometrisch quantifiziert. Das untere Bild zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SD der Signalintensitäten. Zwischen der Kontrolllinie CON3 und den RS1-antisense Linien AS6 und AS8 konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ )

Identische Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen zeigten eine zehnfach erhöhte Synthese der SGLT1-mRNA in den RS1-antisense Zelllinien AS6 und AS8 im Vergleich zu der Kontrollzelllinie CON3 (\*\* $p < 0,01$ ). Die Synthese der GLUT1-mRNA war nicht signifikant verändert, wohingegen die Synthese der OCT2-mRNA um den Faktor zwei erhöht war ( $*p < 0,05$ ) (Abb. 7-1).

### 7.1.2 Analyse der Transkriptionsrate

Um zu analysieren, ob in den RS1-antisense Zelllinien die Transkription generell, völlig unspezifisch gesteigert ist, wurde die gesamte neu synthetisierte, radioaktiv markierte mRNA kontrolliert (3.3.6). Die Kontrollzelllinie CON3 und die RS1-antisense Zelllinien AS6 und AS8 wurden wieder mit 5 mM Glukose angezogen und 5 Tage nach Konfluenz geerntet. Nach der Isolation wurden die Kerne mit radioaktiv markiertem  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dUTP unter identischen Bedingungen wie im vorangegangenen Experiment 30 min lang inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion wurden die frisch synthetisierten, markierten mRNAs über Reinigungssäulen von dem restlichen freien radioaktiven  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dUTP abgetrennt. Die Radioaktivität der neu gebildeten Transkripte wurde im Counterzähler bestimmt. Vergleichbare Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen ergaben keine Differenz in der allgemeinen Transkriptionsrate der RS1-antisense Zelllinien AS6 ( $2,5 \times 10^5 \pm 0,46 \times 10^5$  dpm) und AS8 ( $2,7 \times 10^5 \pm 0,56 \times 10^5$  dpm) und Kontrollzelllinie CON3 ( $2,7 \times 10^5 \pm 0,32 \times 10^5$  dpm) (Abb. 7-2). Die Daten deuten darauf hin, dass die Transkriptionsrate in den RS1-antisense Zelllinien nicht generell erhöht ist, sondern nur spezifisch für bestimmte Plasmamembrantransporter, insbesondere für den SGLT1.



**Abb. 7-2 Analyse der Transkriptionsrate von RS1-antisense LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen**

Zelllinien, die entweder mit dem pRcCMV-Vektor (CON3) oder mit dem pRcCMV-Vektor, der antisense-RS1 enthielt (AS6 und AS8), stabil transfizierte waren, wurden in Gegenwart von 5 mM Glukose angezogen und 5 Tage nach Konfluenz geerntet. Die Kerne wurden isoliert und mit ATP, GTP, CTP und [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]UTP 30 min inkubiert. Die neu synthetisierten RNAs wurden isoliert und die Radioaktivität der frisch synthetisierten mRNA bestimmt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrolllinie CON3 und RS1-antisense Linien AS6 und AS8 festgestellt werden. Mittelwerte  $\pm$  SD.

In den RS1-antisense Zelllinien zeigte sich eine 10fach erhöhte mRNA-Synthese spezifisch für den SGLT1, die gesamte Transkriptionsrate war allerdings unverändert. RS1 scheint an der Repression der Transkription, vor allem von SGLT1, beteiligt zu sein. Da gezeigt worden ist, dass RS1 in den Zellkern gelangen kann (Kühlkamp, 2001), ist anzunehmen, dass RS1 seine Wirkung auf die Transkription im Zellkern entfaltet. RS1 besitzt keine bekannten Motive für die Interaktion mit der DNA, deshalb ist eine Interaktion mit Transkriptionsfaktoren vorstellbar. In der Promotorregion von SGLT1 konnten ein oder eventuell zwei Bereiche für die transkriptionale Suppression nachgewiesen werden (Wood et al., 1999). Es wäre möglich, dass hier RS1 eine Rolle spielt. Allerdings ist die Transkriptionskontrolle auch durch die Ausbildung von Zell-Zellkontakten beeinflusst (Yet et al., 1994). Erst bei konfluenten Zellen findet eine Transkription des SGLT1 statt (Suzuki et al., 1996). An den LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen gibt es demzufolge einen Signalweg von der Plasmamembran, an der die Zellkontakte registriert werden, zum Kern, in dem die Transkription beeinflusst wird. Das membranassoziierte RS1 scheint in diesen Signalweg einzugreifen und inhibierend auf die Transkription von SGLT1 zu wirken.

Hier gibt es Parallelen zu dem membranständigen Signaltransduktionsprotein  $\beta$ -Catenin. Es verbindet die Cadherin Zelladhäsionsmoleküle mit dem Cytoskelett und reguliert die Genexpression durch direkte Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF Familie (Behrens et al., 1996; Sadot et al., 1998).

Die Funktion von RS1 könnte Ähnlichkeit mit der sterolabhängigen Freisetzung von Transkriptionsfaktoren haben. Cholesterin bindet an Proteine aus dem Endoplasmatischen Reticulum, die zunächst membrangebunden sind und dann die Transkription zu verändern vermögen (Brown et al., 1998).

Die zentrale Erkenntnis dieser Untersuchung bestand darin, dass RS1 als intrazelluläres, membranassoziiertes Protein im Sinn eines Inhibitors an der transkriptionellen Regulation von Plasmamembrantransportern, insbesondere von SGLT1, beteiligt ist.

Die weiteren im Anhang aufgenommenen Daten beinhalten Versuche, die nicht im direkten Zusammenhang mit der Aufklärung der Funktion und der Wirkungsweise des RS1 Proteins stehen. Die beschriebenen Daten wurden in Kooperation mit anderen Arbeiten erstellt und dienen zum einen der Aufklärung der Lokalisation des Schweine SGLT1 im Gehirn und zum anderen der Lokalisation des humanen SGLT3 (hSAAT).

## **7.2 Untersuchungen zum Schweine SGLT1**

### **7.2.1 Nachweis des pSGLT1 in Endothelzellen des Gehirns**

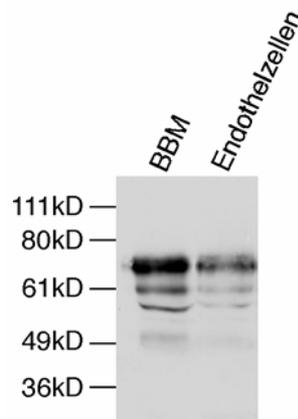
Untersuchungen zum Schweine SGLT1 wurden im Zusammenhang mit der Doktorarbeit von Katrin Schwaiger, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg, durchgeführt.

In Endothelzellen des Schweins wurde die Transkription des Na<sup>+</sup>-abhängigen D-Glukosetransporter SGLT1 mittels RT-PCR nachgewiesen (Pope et al., 1997). Darüber hinaus deuteten weitere Versuche auf eine Transkription und Expression dieses Proteins im ischämisch geschädigten Rattengehirn hin. (Köhler, Promotionsarbeit) Bei der immunhistologischen Untersuchung an Koronarschnitten durch das Großhirn der Ratte zeigte sich zunächst ein ähnliches Bild wie in den von Herrn Dr. U. Karbach angefertigten immunhistologischen Präparaten (Pope et al., 1997). Dennoch muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass sich die nachweisbar zellulären Reaktionen in Großhirnrinde, Hippokampus und Zerebellum bei einer Kerngegenfärbung mit DAPI und der näheren Betrachtung in der konfokalen Laserscannmikroskopie als Anfärbungen des Zellkerns herausstellten (Katrin Schwaiger, persönliche Mitteilung, Promotionsarbeit). Die Originalpräparate zur Arbeit von Herrn Dr. Karbach lagen leider nicht mehr vor, aber ein Vergleich mit lichtmikroskopischen Abbildungen ließen dennoch eine gute Übereinstimmung erkennen. Nähere Aussagen zu diesem Thema ließen sich nicht mehr machen, zumal in der älteren Arbeit keine Kerngegenfärbung durchgeführt wurde.

Katrin Schwaiger konnte in ihrer Promotionsarbeit im Kapillarnetz aller Hirnareale eine Proteinexpression des rSGLT1 nachweisen. Eine Gegenfärbung durch die Immundetektion mit einem Antikörper gegen den „von Willebrandfaktor“ zeigte eine Übereinstimmung des Expressionsmusters beider Proteine. Der Antikörper gegen den von Willebrandfaktor dient als Marker zum Nachweis von Kapillaren. Durch die Kolo-kalisation konnte bewiesen werden, dass sich auch der Na<sup>+</sup>-D-Glukosetransporter der Ratte rSGLT1 in Kapillaren befindet. Des Weiteren fanden sich bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der Doppelfluoreszenz auch eindeutige Hinweise auf eine lumina-le Lokalisation des Na<sup>+</sup>-abhängigen Zuckertransporters (Katrin Schwaiger,

persönliche Mitteilung, Promotionsarbeit). In dieser Arbeit sollte nun gezeigt werden, ob SGLT1 auch beim Schweinegehirn entsprechend den oben beschriebenen Ergebnissen zu lokalisieren ist.

Die Proteinexpression des Plasmamembrantransporters pSGLT1 wurde an einer Endothelzelllinie des Gehirns und an Bürstensaummembranen der Niere als Positivkontrolle im Western-Blot gezeigt. Dazu wurden die präparierten Membranen einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und einer Markierung mit dem Schweine-SGLT1 Antikörper unterzogen. Die Herstellung Schweine-SGLT1 (AS 525 – 541: EAPEETIEIEVP EEKKG-C) wurde von Dr. Ulrich Karbach, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Würzburg, übernommen. Der Na<sup>+</sup>-abhängigen D-Glukosekotransporter pSGLT1 konnte sowohl in den Bürstensaummembranen der Niere (BBM) als auch in den Endothelzellenmembranen mit dem affinitätsgereinigten, polyklonalen Peptidantikörper nachgewiesen werden (Abb. 7-3). Die Detektion der pSGLT1-Banden konnte durch Präabsorption des Antikörpers mit dem antigenen Peptid blockiert werden (Daten nicht gezeigt).

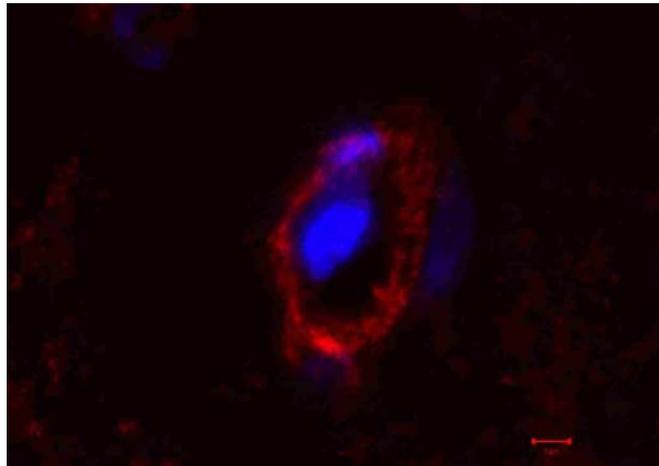


**Abb. 7-3 Nachweis des pSGLT1-Proteins an Endothelzellen des Schweinehirns**

Für den Western-Blot wurden Bürstensaummembranen, die von Irina Schatz Institut für Anatomie und Zellbiologie, Würzburg, isoliert wurden (Koepsell and Seibicke, 1990), verwendet. Die Fraktionen der angereicherten Plasmamembranen der Endothelzellen wurden entsprechend der in Kapitel 3.4.2.1 beschriebenen Methode erhalten. Die Proteinproben wurden in Laemmli-Puffer denaturiert und je 15 µg in der SDS-PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde für den Nachweis des p-SGLT1 das affinitätsgereinigte anti-pSGLT1 Serum 185/V in der Verdünnung 1:100 verwendet.

## 7.2.2 Immunhistologischer Nachweis von pSGLT1 am Gehirn

Frau Katrin Schwaiger, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg konnte in immunhistochemischen Versuchen ihrer Doktorarbeit zeigen, dass bei der Ratte in allen Hirnarealen rSGLT1-Protein im Kapillarnetz vorhanden ist. Die bereits beschriebene Kolo-kalisation mit dem von Willebrandfaktor, die eine Übereinstimmung beider Proteine zeigte, erhärtete diesen Befund. In diesem Zusammenhang sollte gezeigt werden, ob das pSGLT1-Protein auch in Kapillaren des Schweinegehirns zu finden ist. Das Gehirn wurde nach der Entnahme in Isopentan schockgefroren und konnte bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert werden. Für die Immunhistologie wurden am Kryotom bei  $-20^{\circ}\text{C}$  Objektträgertemperatur und  $-24^{\circ}\text{C}$  Kammertemperatur  $5\ \mu\text{m}$  dicke Gefrierschnitte erstellt. Nach der Fixierung wurden die Schnitte mit dem polyklonalen, affinitätsgereinigten Peptidantikörper gegen pSGLT1 (AS 525 – 541: EAPEETIEIEVPPEEKKG-C) inkubiert. In den Präparaten zeigte sich eine Fluoreszenz in Kapillaren des Kleinhirns. In der Detailvergrößerung am Laserscanmikroskop ist die Fluoreszenz deutlich zu erkennen. Zusätzlich ist die Anfärbung eines Zellkerns durch den blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI zu sehen.



**Abb. 7-4 Immunhistologischer Nachweis des pSGLT1 am Schweinegehirn**

*Konfokale Laserscanmikroskopie eines beispielhaften Ausschnitts der Reaktion des affinitätsgereinigten anti-pSGLT1-Antikörpers (185/V, 1:50 verdünnt) an paraformaldehydfixiertem Gehirngewebe des Schweins. Es ist eine Detailvergrößerung aus dem Kleinhirn abgebildet. Das Fluoreszenzsignal, hervorgerufen durch die Reaktion mit dem anti-pSGLT1-Antikörper, ist in einer Kapillaren zu sehen. Gleichzeitig ist die blaue DAPI-Anfärbung eines Zellkerns gezeigt. (—  $2\ \mu\text{m}$ ).*

Diese Ergebnisse zur Lokalisation des pSGLT1 in den Kapillaren des Schweinegehirns stehen im Einklang mit den Untersuchungen, die Katrin Schwaiger am Rattenhirn durchgeführt hat.

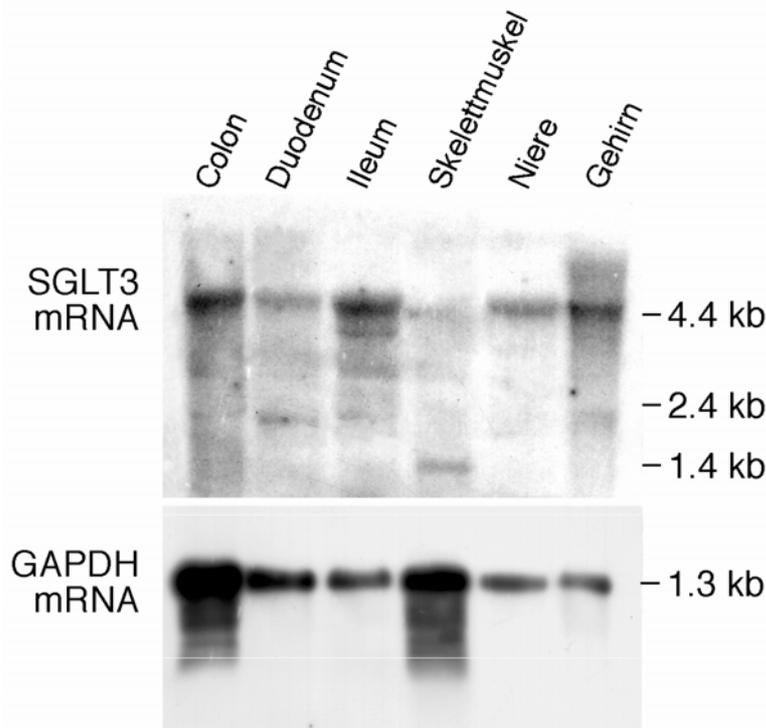
### 7.3 Untersuchungen zum humanen SGLT3

Der humane SGLT3, der als niederaffiner Na<sup>+</sup>-abhängiger Glukosekotrporter galt, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. H. Koepsell, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg, kloniert. In einer Kooperation mit Ernest Wright, Department of Physiology, UCLA School of Medicine, Center for the Health Sciences, Los Angeles, USA, stellte sich heraus, dass der hSGLT3 ein durch D-Glukose regulierter Kanal ist. Um Schlüsse ziehen zu können, welche physiologische Rolle der menschliche SGLT3 spielt, wurde er im Rahmen dieser Arbeit lokalisiert.

#### 7.3.1 Nachweis der hSGLT3-mRNA in verschiedenen Geweben

Anhand von Northern-Blot-Hybridisierungen sollte gezeigt werden, in welchen Geweben der humanen SGLT3 exprimiert wird. Dazu wurden mRNAs aus menschlichem Colon, Duodenum, Ileum, Skelettmuskel, Niere und Gehirn isoliert.

Da der Schweine-SGLT3 im Dünndarm und im Muskelgewebe beschrieben worden ist (Kong et al., 1993), war anzunehmen, dass auch der menschliche SGLT3 in diesen Geweben zu finden ist. Diese Hypothese bestätigte sich, der menschliche SGLT3 war aber auch in der Niere und im Gehirn nachzuweisen.



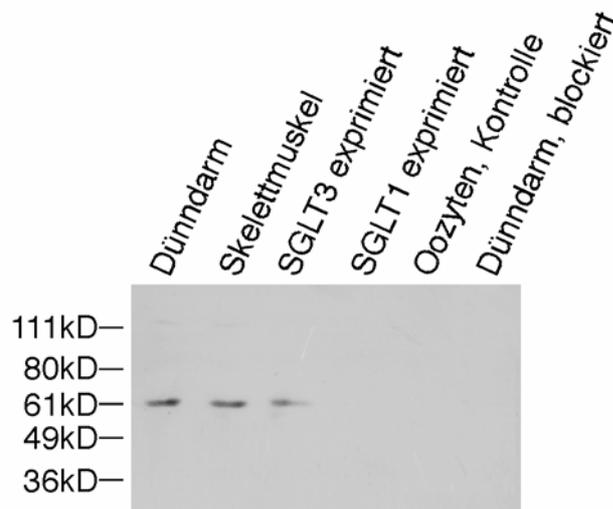
**Abb. 7-5 hSGLT3-mRNA-Expression in verschiedenen menschlichen Geweben**

Für den Northern-Blot wurden je Spur 5µg mRNA aus verschiedenen menschlichen Geweben im Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran geblottet und hybridisiert. Als hSGLT3-Sonde wurde ein Fragment, das die Nukleotide 1730-2032 (# AJ133127) umfasste, eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Beladungskontrolle mit einer h-GAPDH-Sonde, Nukleotide 256-866 (# J02642) durchgeführt.

Abbildung 7-5 zeigt, dass in allen untersuchten Geweben mRNA des hSGLT3 auf der Höhe von 4,4 kb detektiert werden konnte. Allerdings sind zum Teil Degradierungen zu beobachten, vor allem am Muskel ist eine Bande auf der Höhe von 1,4 kb zu sehen, die auf ein Spaltprodukt hindeutet.

### 7.3.2 hSGLT3- Proteinexpression in Dünndarm und Skelettmuskel

Obwohl die Expression des menschlichen SGLT3 auch in Niere und Gehirn gezeigt wurde, beschränkten sich die weiteren Untersuchungen zunächst auf Darm und Skelettmuskel. Um die hSGLT3-Proteinexpression zu untersuchen, wurden Gesamtmembranen des ganzen Dünndarms, des Skelettmuskels und von Oozyten isoliert. In die Oozyten ist fünf Tage vor der Membranpräparation von Dr. Christopher Volk, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg, cRNA des hSGLT1 oder des hSGLT3 beziehungsweise Wasser injiziert worden. Nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, wurde eine Western-Blot Detektion mit einem selbsthergestellten Antikörper gegen den humanen SGLT3 (AS 576 – 593: EEKSQEETDDGVEEDYPES-C) durchgeführt.



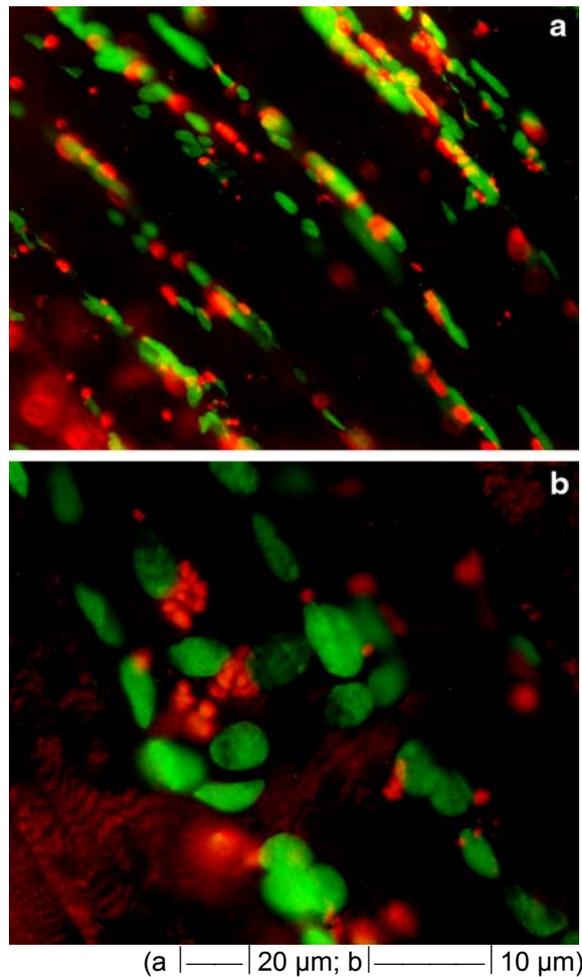
**Abb. 7-6 Western-Blot: Nachweis des hSGLT3-Proteins**

Plasmamembranen wurden von Geweben und Oozyten isoliert, je 20 µg der Proteinproben in Laemmli-Puffer denaturiert und in der SDS-PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde für den Nachweis des h-SGLT3 Proteins das affinitätsgereinigte, polyklonale anti-hSGLT3 Serum (78/II) (Verdünnung 1:1000) verwendet. Das Signal bei 60 kD konnte in Darm, Skelettmuskel und hSGLT3 injizierten Oozyten detektiert werden. Bei SGLT1 injizierten und den Kontrolloozyten, so wie nach Präabsorption des Antikörpers mit dem antigenen Peptid wurde keine Bande detektiert.

Mittels des von mir im Kaninchen erzeugten, affinitätsgereinigten Peptidantikörpers hSGLT3 konnte im Dünndarm, im Skelettmuskel, so wie in den hSGLT3-Oozyten, die als Positivkontrolle dienten, SGLT3-Protein nachgewiesen werden. In den mit hSGLT1-cRNA injizierten Oozyten und den wasserinjizierten Kontrolloozyten hingegen wurde kein Signal mit dem hSGLT3-Antikörper detektiert. Damit war die Spezifität des hSGLT3-Antikörpers bewiesen. Dieser Befund wurde dadurch erhärtet, dass die Detektion der SGLT3-Bande bei ca. 60 kD durch Präabsorption des Antikörpers mit dem Peptid blockiert werden konnte (Abb. 7-6)

### **7.3.3 Lokalisation des hSGLT3-Proteins im Muskel**

Die subzelluläre Lokalisation des hSGLT3-Proteins wurde mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen. Menschlicher Muskel, der aus einer Skelettmuskel-Biopsie stammte und von der Universitäts-Klinik Würzburg zur Verfügung gestellt wurde, wurde so schnell wie möglich in Isopentan schockgefroren. Für die Immunhistologie wurden am Kryotom bei -16°C Objektträgertemperatur und -20°C Kammertemperatur 5 µm dicke Längs- und Querschnitte erstellt. Nach der Fixierung wurden die Schnitte mit dem oben beschriebenen, affinitätsgereinigten Peptidantikörper gegen hSGLT3 inkubiert. In Abbildung 7-7 ist ein Längsschnitt in zwei verschiedenen Vergrößerungen abgebildet. Das rote Signal des hSGLT3 konnte auf der Plasmamembran an einzelnen Stellen neben den Zellkernen lokalisiert werden. Zur besseren Analyse wurde die ursprünglich blaue DAPI-Kernfluoreszenz nach grün umgefärbt. Bei einer Kernlokalisation müsste es durch Überlagerung zu einer Gelbfärbung kommen. hSGLT3 konnte nicht in den Zellkernen ermittelt werden, da keine gelben Signale zu erkennen waren.

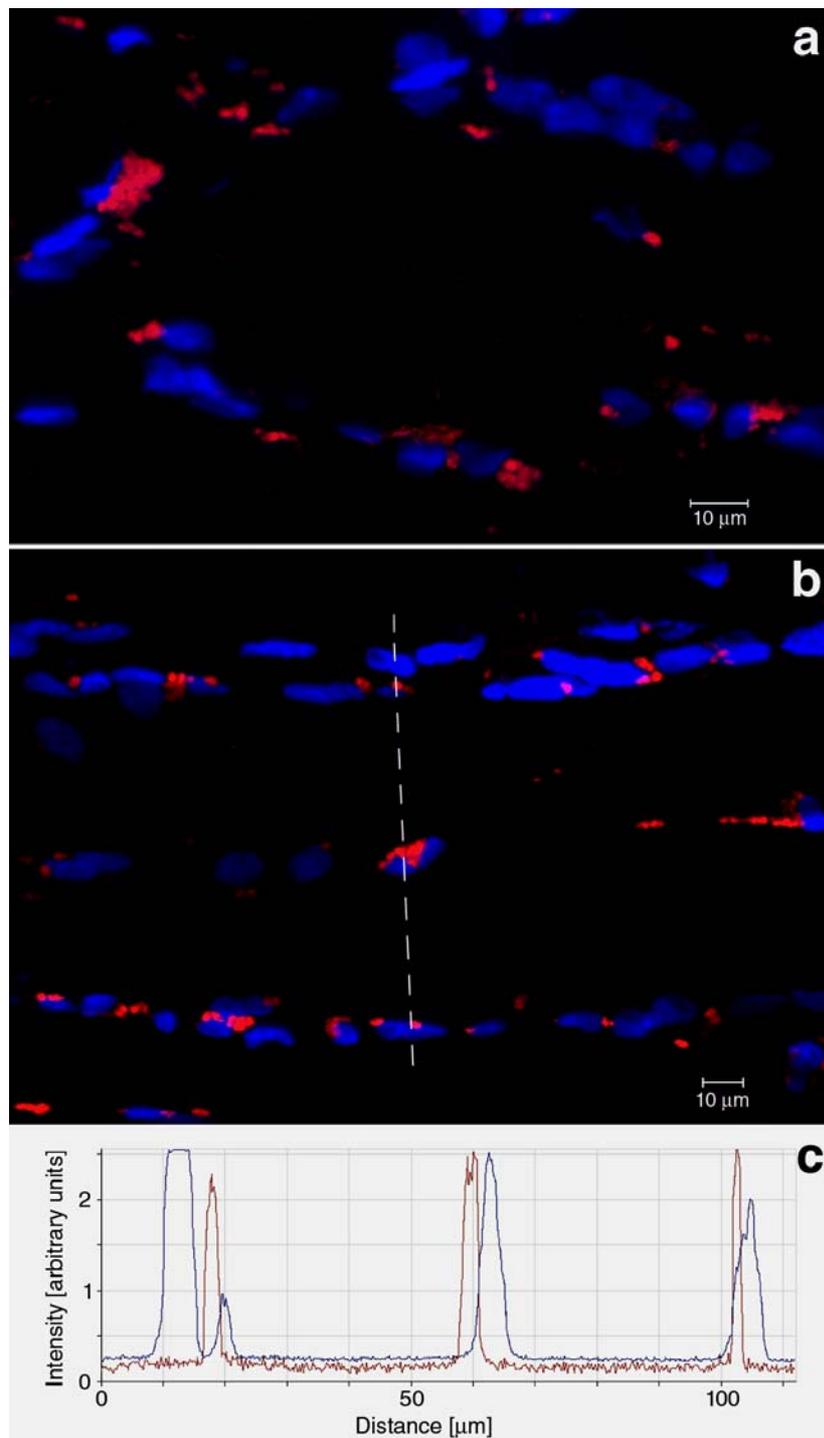


**Abb. 7-7 Immunhistochemische Lokalisation des hSGLT3 am Muskel**

Beispielhafter Ausschnitt der Reaktion des affinitätsgereinigten anti-hSGLT3-Antikörpers (78/II) (Verdünnung 1:200) an paraformaldehydfixiertem Muskel des Menschen. Bild a und b zeigen einen repräsentativen Längsschnitt durch menschliches Muskelgewebe in zwei verschiedenen Vergrößerungen (a — 20 µm; b — 10 µm). Das Signal ist auf der Plasmamembran an diskreten Stellen neben den Kernen zu erkennen. Gleichzeitig ist die entsprechende DAPI-Anfärbung der Kerne abgebildet. Die ursprünglich blaue Kernanfärbung wurde nach grün umgefärbt. Es erscheinen keine gelben Signale der Überlagerung.

Zur Überprüfung der Lokalisation wurden Quer- (Abbildung 7-8a) und Längsschnitte (Bild b) des menschlichen Muskels am Laserscan-Mikroskop betrachtet. Als Sekundärrantikörper wurde, wie bereits beschrieben, ein mit Indocarbocyanin (Cy3) konjugierter anti-rabbit-IgG-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment Antikörper aus der Ziege verwendet. Durch Bild b wurde eine Achse gelegt, anhand der geprüft werden konnte, ob sich die Signale der Antikörperfluoreszenz und der Kernfluoreszenz überlagern oder nacheinander erscheinen. Die Signale überlagerten sich nicht (Bild c). Damit war nochmals bewiesen,

dass die Signale des h-SGLT3 Antikörpers und damit auch das Protein nicht im Zellkern lokalisiert sind.

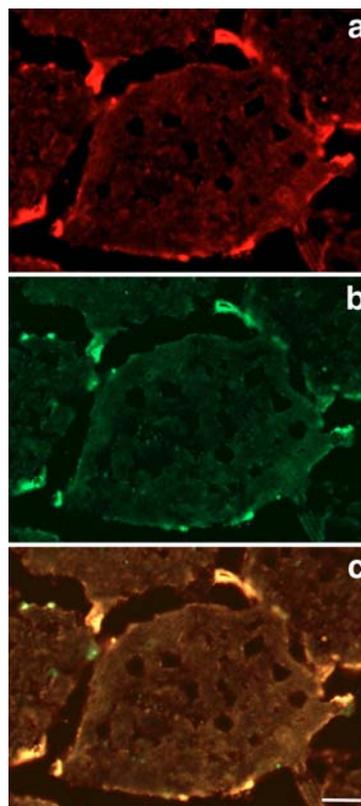


**Abb. 7-8 Konfokale Laserscan-Aufnahme der Reaktion des hSGLT3-Antikörpers am Muskel**

Reaktion des anti-hSGLT3-Antikörpers (78/II) (Verdünnung 1:200) an paraformaldehydfixiertem Muskel des Menschen. Die Kerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI blau markiert. Bild a zeigt einen Querschnitt, Bild b einen Längsschnitt durch menschliches Muskelgewebe, Bild c ist die Signalanalyse der Achse durch Bild b. Das Signal des Antikörpers gegen hSGLT3 und das Fluoreszenzsignal der Kernanfärbung überlagern sich nach dieser Analyse nicht. (a, b /—/10 μm)

### 7.3.4 Immunhistologischer Nachweis von hSGLT3 am Muskel mit Doppelmarkierung

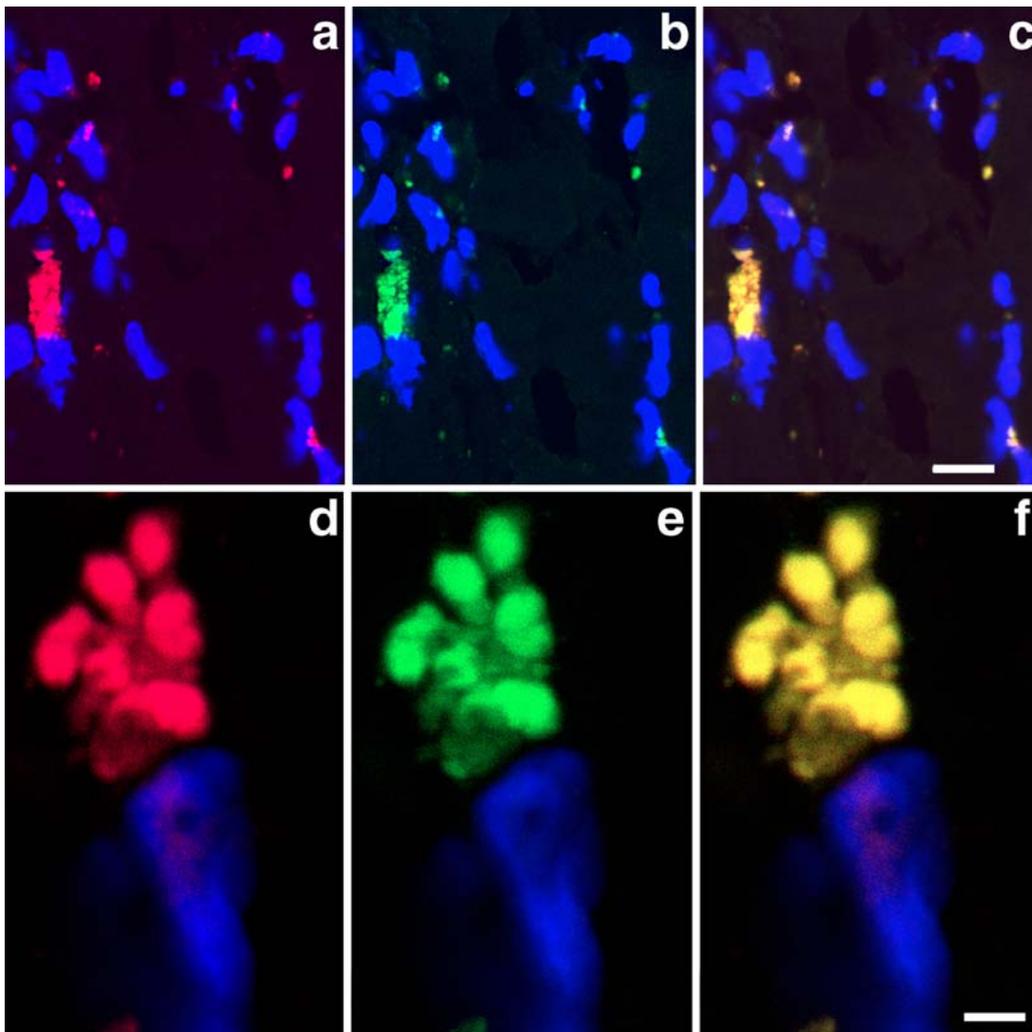
Aufgrund der bisherigen Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich das Signal des hSGLT3 an der motorischen Endplatte befinden könnte. Für eine genaue Einordnung des Signals des hSGLT3-Antikörpers im menschlichen Muskelgewebe war eine Doppelmarkierung notwendig. Dazu wurde ein monoklonaler anti-mouse-IgG1-Antikörper gegen den humanen Acetylcholin Rezeptor (beta subunit) (Whiting et al., 1986) verwendet. Prinzipiell wurde die Immunfluoreszenz entsprechend der Einfachmarkierung durchgeführt, der zusätzliche Antikörper wurde dem Primärantikörper gegen den humanen SGLT3 beigemischt. Als Sekundärantikörper für den anti-hAcetylcholin-Rezeptor Antikörper diente ein mit Carbocyanin (Cy2) konjugierter anti-mouse-IgG-F(ab')<sub>2</sub>-Fragment Antikörper, der eine grüne Fluoreszenz verursachte. Für den hSGLT3-Antikörper wurde, wie auch in den vorangegangenen Experimenten, der Cy3gekoppelte Sekundärantikörper, der eine rote Fluoreszenz hervorrief, benutzt.



**Abb. 7-9 Immunhistologische Doppelmarkierung am Muskel**

Reaktion des affinitätsgereinigten, polyklonalen anti-hSGLT3-Antikörpers (78/II) und des monoklonalen anti-mouse-IgG1-Antikörper (Verdünnung 1:100) gegen den humanen Acetylcholin Rezeptor (Verdünnung 1:3) am Querschnitt den Muskels. Bild a zeigt die Reaktion des hSGLT3 mit dem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:2000), Bild b den hAcetylcholin Rezeptor mit dem Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:200), Bild c die Überlagerung beider Bilder. Die Kolokalisation führt bei Überlagerung zu einem gelben Signal. (— 10  $\mu$ m).

Eine Kolokalisation mit dem Acetylcholin Rezeptor zeigte eine Übereinstimmung beider Proteine an der Plasmamembran. In Abbildung 7-9 ist ein Ausschnitt eines Querschnitts durch menschliches Muskelgewebe, in Abbildung 7-10 ist ein Ausschnitt eines Längsschnitts in zwei verschiedenen Vergrößerungen zu sehen. Durch die Anfärbung mit DAPI sind die Kerne deutlich blau gefärbt zu erkennen. Die Aufnahmen in Abbildung 7-9 und 10 wurden am konfokalen Laserscanmikroskop gemacht.



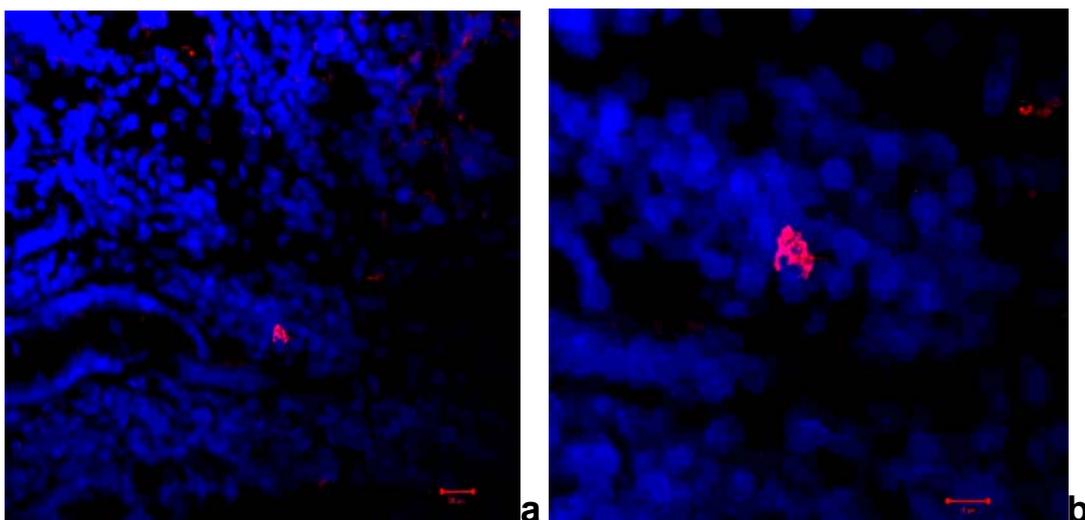
**Abb. 7-10 Immunhistologische Doppelmarkierung am Muskel**

Beispielhafte Aufnahmen der Reaktion des affinitätsgereinigten anti-hSGLT3-Antikörpers (78/II) (Verdünnung 1:100) und des Antikörpers gegen den humanen Acetylcholin Rezeptor (Verdünnung 1:3) am Längsschnitt des menschlichen Muskels. Bild a und d zeigen die Reaktionen hSGLT3 mit dem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:2000), Bild b den hAcetylcholin Rezeptor mit dem Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:200), Bild c und f die Überlagerung der jeweiligen beiden Bilder. Die Kolokalisation an der motorischen Endplatte ist deutlich an der gelben Einfärbung zu erkennen. (a bis c — 10 µm; d bis f — 2 µm).

Der Antikörper gegen den humanen Acetylcholin Rezeptor dient als Marker zum Nachweis der motorischen Endplatte. Eine Gegenfärbung durch die Immundetektion mit dem Antikörper gegen den humanen Acetylcholin Rezeptor zeigte eine Übereinstimmung des Expressionsmusters beider Proteine. In Abbildung 7-10 ist ein Längsschnitt mit Kolokalisation beider Proteine an der motorischen Endplatte gezeigt. Die Übereinstimmung der Markierungen führt bei Überlagerung zu einem gelben Signal (Bild c).

### 7.3.5 Immunhistologischer Nachweis von hSGLT3 am Duodenum

Auch am menschlichen Darm wurde die subzelluläre Verteilung des hSGLT3-Proteins immunhistochemisch untersucht. In Isopentan schockgefrorenes Duodenum wurde am Kryotom bei  $-16^{\circ}\text{C}$  Objektträgertemperatur und  $-20^{\circ}\text{C}$  Kammertemperatur  $5\ \mu\text{m}$  dick für die Immunhistologie geschnitten. Nach der Fixierung in Paraformaldehyd wurden die Schnitte direkt mit dem Peptidantikörper gegen den hSGLT3 inkubiert. In Abbildung 7-11 ist eine repräsentative Reaktion zu sehen. Die Zellkerne sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI blau angefärbt. Es konnte kein Signal des hSGLT3 am Epithel der Dünndarmzellen detektiert werden. Der hSGLT3 verursacht eine Reaktion an einzelnen Stellen am Übergang von den Darmzotten zu den Krypten. Auch am menschlichen Dünndarm stimmte die Lokalisation des hSGLT3 mit der dem Acetylcholin-Rezeptor überein (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 7-11 Aufnahmen am konfokalen Laserscan des immunhistologischen Nachweises von hSGLT3 am Duodenum**

Reaktion des affinitätsgereinigten anti-hSGLT3-Antikörpers (78/II) (Verdünnung 1:100) am paraformaldehydfixiertem Duodenum des Menschen. Gleichzeitig ist die entsprechende DAPI-Anfärbung der Kerne zu sehen (a —  $20\ \mu\text{m}$ ; b —  $10\ \mu\text{m}$ ).

Aus den Ergebnissen kann man den Schluss ziehen, dass SGLT3 im menschlichen Darm in cholinergen Neuronen des Plexus submucosus und des Plexus myentericus exprimiert ist. Im Skelettmuskel deutet die Lokalisation auf eine Expression in neuromuskulären Synapsen hin. Aus den Bildern der konfokalen Laserscan-Mikroskopie ist allerdings nicht zu entnehmen, ob der SGLT3 an der prä- oder der postsynaptischen Membran der neuromuskulären Verbindung sitzt.

Der menschliche SGLT3 könnte als Glukosesensor fungieren, der Muskelaktivität moduliert. Glukose ist nicht nur ein Nahrungsmittel, sondern kann auch hormonähnliche Regulationsfunktion besitzen (Rolland et al., 2001). Erst vor kurzem sind glukoseempfindliche Neuronen und Drüsenzellen bei Säugetieren identifiziert worden. Es gibt neuste Beweise, dass einige SGLTs als Glukosesensoren in endokrinen Zellen dienen können (Kim et al., 2001). Zudem ist bereits postuliert worden, dass sich metabolismusabhängige Glukosesensoren aus vorhandenen Proteinen mit einer Glukose-Bindungsstelle entwickelt haben, indem sie eine regulatorische Bindungsstelle für einen Signalweg erwarben (Rolland et al., 2001).

Man könnte nach den derzeitigen Untersuchungen annehmen, dass sich hSGLT3 von einem Glukosekotrporter zu einem Sensor, der Informationen über die externe Glukosekonzentration durch Änderungen im Membranpotential übermittelt, entwickelt hat. Der Einfluss von Plasmaglukosekonzentrationen bei der Regulation der Aktivität der glatten Muskulatur ist bereits am Meerschweinchen untersucht worden. Eine Gruppe von cholinergen Neuronen im Plexus myentericus reagiert auf das Vorhandensein der Glukose mit einer Depolarisierung des Membranpotentials (Liu et al., 1999). Beim hSGLT3 könnte das Signal die direkte Depolarisierung der Zellmembran in Erwiderung auf zunehmende Plasmaglukosekonzentration sein, so dass Änderungen in der Plasmaglukosekonzentration neuromuskuläre Tätigkeiten modulieren. Diese Hypothese wird durch Untersuchungen an Oozyten, in denen hSGLT3 exprimiert wurde, unterstützt. Das Hinzufügen von 5 mM D-Glukose verursachte eine sofortige Depolarisierung des Membranpotentials. Dieser Effekt konnte durch Phlorizin gehemmt werden (Wright, persönliche Mitteilung 2001). D-Galaktose andererseits depolarisierte die Oozyten nicht. Änderungen des Glukoseniveaus führen entweder zur Depolarisierung von Neuronen oder von Muskelzellen an neuromuskulären Synapsen. Dadurch können Neurotransmission und Muskeltätigkeit beeinflusst werden. Die niedrige Affinität für Glukose ( $\sim 50$  mM für zuckerinduzierten Strom; Wright, persönliche Mitteilung 2001) erlaubt eine Empfindlichkeit über einen großen Bereich von Konzentrationen. Folglich ergeben kleine Änderungen der Glukosekonzentrationen im normalen physiologischen Bereich bedeutende Änderungen des Membranpotentials.

Kleine Änderungen eines Proteins können so zu großen Funktionsänderungen führen. Proteine können sich ändern, um verschiedenen Zwecken zu dienen. Sie können aber auch in bestimmten Geweben oder an einer bestimmten Stellen exprimiert werden, in beziehungsweise an denen „sekundäre“ Funktionseigenschaften ausgenutzt werden können.

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BBM	Bürstensaummembran
BES	N, N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-amino-ethansulfonsäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosin- Monophosphat
Ci	Curie
cm	Zentimeter
CTP	Cytidinin-5'-triphosphat
Cy2	mit Carbocyanin gekoppelter Sekundärantikörper
Cy3	mit Indocarbocyanin gekoppelter Sekundärantikörper
DAPI	4,6-Diamidino-2Phenylindoldichlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithio-DL-thrietol
ECL	Enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylen-N',N',N',N',-tetraessigsäure
EGTA	Ethylglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FCS	fetales Rinderserum
G	Guanin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein
GLUT	Glukosetransporter
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
h-	humaner
HDL	High density Lipoprotein
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalctopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kD	Kilodalton
ko	knock-out
Km	Michaelis Menten Konstante
km	Kilometer
KPg	Körpergewicht
LDL	Low density Lipoprotein
Lsg	Lösung
m-	Mäuse-
M	Molar
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm

ml	Milliliter
µl	Mikroliter
min	Minuten
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
mmol	Millimol
mol	Mol
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
N	Normal
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OCT	organischer Kationentransporter
OD	optische Dichte
p-	Schweine
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
POX	Meerrettichperoxidase
r-	Ratten-
rb-	Kaninchen-
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RS	Regulatory subunit
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodeccylsulphate
SE	Standardfehler
SGLT	Na <sup>+</sup> abhängiger D-Glukose Kotransporter
SSC	Salines Sodiumcitrat
SSPE	Salines Sodiumphosphate, EDTA buffered
T	Thymin
TBS	Tris buffered saline
TE	Tris/EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymin-5'-triphosphat
U	Unit (Einheit)
UTP	Uridin-5'-triphosphat
V	Volt
Vmax	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
Wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
xg	Erdbeschleunigung

**Abkürzungen von Aminosäuren**

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asperagin	Asn	N
Asperaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Gycin	Gly	G
Histidin	His	H
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Professor Hermann Koepsell danke ich für die Bereitstellung des Themas und die freundliche, umfassende und engagierte Betreuung.

Herrn Professor Roland Benz danke ich für die Übernahme der Vertretung der Fakultät Biologie bei dieser Dissertation.

Bei Dr. Valentin Gorboulev bedanke ich mich für die souveräne Betreuung in allen wissenschaftlichen und labortechnischen Fragen.

Mein Dank gilt auch Irina Schatz und Dr. Aida Akhundova, die mir bei zahlreichen Experimenten mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Dr. Katharina Baumgarten und Dr. Ulrich Karbach danke ich für die Einarbeitung und Unterstützung zu Beginn meiner Arbeit.

Bei Dr. Thomas Kühlkamp für die gute Zusammenarbeit am „RS1-Projekt“ und viele weiterführende Gespräche.

Bei Christian Popp, Dr. Christopher Volk, Dr. Maïke Veyhl, Dr. Bernhard Schmitt, Katrin Schwaiger, Daniela Scholz, Alexander Sturm, Brigitte Dürner und Matthias Kroiß bedanke ich mich für die nette Gesellschaft und die Hilfsbereitschaft im Laboralltag. Durch viele weiterführende Gespräche und Diskussionen konnten auch neue Aspekte für diese Arbeit gewonnen werden.

Marina Akimjanova danke ich für die Übernahme der RS1-knock-out Mäuse.

Bei Michael Christof bedanke ich mich für die unkomplizierte Zusammenarbeit bei der Erstellung zahlreicher Abbildungen und Grafiken.

Doris Dettelbacher-Weber danke ich für die Fotoarbeiten.

Prof. Georg Krohne, Prof. Ernest Wright, Dr. Frank Stümpel und den jeweiligen Arbeitsgruppe möchte ich für gute Kooperationen danken und Dr. Jochen Seufert für kompetente Beratung im Bereich „Leptin“.

Meinen Eltern danke ich, dass sie es mir ermöglicht haben zu studieren.

Und zuletzt danke ich meinem Mann Stefan, der immer wieder Geduld für mich und meine Doktorarbeit aufbringen musste.



## Lebenslauf:

*Name :* Christina Oßwald, geb. Track  
*Geburtsdatum:* 28. Oktober 1972  
*Geburtsort:* Erlangen  
*Familienstand:* verheiratet  
*Nationalität:* deutsch



### **seit Februar 2002**

Anwärterin für das Lehramt an Gymnasien, Bayern  
Friedrich-Koenig-Gymnasium, Würzburg  
(Zweigschuleinsatz: Regiomontanus-Gymnasium, Haßfurt  
und Riemenschneider-Gymnasium, Würzburg)

### **November 1998 bis Januar 2002**

wissenschaftliche Mitarbeiterin und Doktorandin  
am Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Universität Würzburg  
bei Prof. Dr. H. Koepsell

### **November 1992 bis August 1998**

Studium für das Lehramt an Gymnasien  
Hauptfächer Biologie und Chemie

*Zwischenprüfungen:*

Biologie: Oktober 1994

Chemie: April 1995

*Zulassungsarbeit:*

April 1996 bis April 1997

am Julius-von-Sachs-Institut für Botanik I  
bei Prof. Dr. H. Gimmler

*erstes Staatsexamen:*

Februar bis August 1998

### **September 1983 bis Juli 1992**

Johann-Sebastian-Bach-Gymnasium, Windsbach  
Allgemeine Hochschulreife

### **September 1979 bis Juli 1983**

Volksschule Neuendettelsau

## Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die Arbeit in allen Teilen selbständig gefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Zudem erkläre ich, dass diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form weder an dieser noch an einer anderen Universität bereits zu einem Promotionsverfahren vorgelegen hat.

Von mir wurden keine früheren akademischen Grade erworben oder versucht zu erwerben.

Ich bitte um Eröffnung des Promotionsverfahrens.

Würzburg, Oktober 2003

  
Christina Böswald