

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

**Identifikation und Charakterisierung neuer Leptin regulierter Gene  
in der Beta-Zelle des endokrinen Pankreas**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Peter Kühnen  
aus Kevelaer

Würzburg, Mai 2005

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

**Koreferent:** Prof. Dr. med. F. Jakob

**Dekan:** Prof. Dr. med. G. Ertl

**Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2005**

**Der Promovend ist Arzt**

# **Inhalt**

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2	1
1.2 Kandidatengene für Diabetes mellitus Typ 2 und Adipositas	3
1.3 Leptin und die Regulation des Körpergewichts	6
1.4 Die adiposinsuläre Achse	8
1.5 Leptin-Signalübertragung	10
1.6 Zielsetzung der Arbeit	14
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1 Geräte	15
2.2 Chemikalien	16
2.3 Enzyme	18
2.4 Kits	18
2.5 DNA Oligonukleotide	19
2.6 Zelllinien	21
2.6.1 INS-1-Zellen	21
2.6.2 Hep-G2 Zellen	21
2.6.3 Zellkulturmedien	21
2.6.4 Zellzählung	22
2.6.5 Passagieren von Zellen	22
2.6.6 Zellstimulation	22
2.7 RNA-Isolation und cDNA Synthese	23
2.7.1 RNA Isolierung	23
2.7.2 Poly-A <sup>+</sup> Isolierung (mRNA)	23
2.7.3 DNase Verdau von Gesamt- und Poly(A)+RNA	24
2.7.4 Reverse Transkription	25
2.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	25
2.9 Subtraktions-PCR	27
2.10 Gelelektrophorese	29

2.10.1 Agarose Gelelektrophorese	29
2.10.2 Formaldehyd Gel	30
2.10.3 Gel Extraktion	31
2.11 Klonierung und Plasmide	31
2.11.1 Klonierung	31
2.11.2 Glycerol stock	32
2.11.3 Plasmidpräparation	33
2.11.4 Restriktionsverdau	33
2.12 Northern Blotting	34
2.12.1 Gel-Membran Transfer	34
2.12.2 Markierung der DNA-Sonden	34
2.12.3 Hybridisierung	35
2.12.4 Waschschrift	35
2.12.5 Membran stripping	36
2.13 Western Blot	36
2.13.1 Whole cell extract	36
2.13.2 BRADFORD Assay	37
2.13.3 SDS-PAGE	37
2.13.4 Proteintransfer	38
2.13.5 Immundetektion und Chemolumineszenz	38
2.14 Densitometrische Auswertung	39
2.15 Immunzytochemie	39
2.16 Insulin – ELISA	40
2.17 DNA-Sequenzierung	41
2.18 PP-1 Aktivitätsassay	42
2.18.1 Zellextraktion	42
2.18.2 Radioaktive Markierung von Glycogen Phosphorylase A	43
2.18.3 Messung der enzymatischen Aktivität	43
2.19 Kalzium Influx Messung mit FURA 2 Methode	45
2.20 Statistik	45

<b>3 Ergebnisse</b>	<b>46</b>
3.1 Regulation der mRNA Expression durch Leptin in INS-1 Beta Zellen	46
3.2 Subtraktions PCR	49
3.3 GPR-56 Serpentine Rezeptor	53
3.4 Secretogranin II (Scg II)	56
3.4.1 Regulation der mRNA und Proteinexpression von Scg II	56
3.4.2 Lokalisation von Scg II in INS-1 Zellen	60
3.5 Protein Phosphatase 1 $\alpha$	61
3.5.1 Regulation der mRNA und Proteinexpression	61
3.5.2 PP-1 $\alpha$ Lokalisation in INS-1 Zellen und humanen Pankreasinseln	65
3.5.3 Insulinsekretion	66
3.5.4 PP-1 Enzymaktivität	68
3.5.5 Messung des Kalzium Influx in INS-1 Zellen	69
<b>4 Diskussion</b>	<b>71</b>
4.1 Regulation der mRNA Expression durch Leptin in INS-1 Beta-Zellen	71
4.2 NeuroD1	71
4.3 GPR 56	72
4.4 Secretogranin II	73
4.5 Protein Phosphatase 1 (PP-1)	75
4.6 Die adipoinsuläre Achse und Diabetes mellitus Typ 2	80
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>82</b>
<b>6 Literatur</b>	<b>83</b>
<b>7 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>94</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2

Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 sind in den letzten Jahren zu einem zentralen Thema unseres Gesundheitssystems geworden. So berichtete die MONICA Studie [1], dass zwischen 1983 und 1986 in Europa im Durchschnitt 15 % aller Männer und 22 % aller Frauen adipös waren mit einem BMI > 30. Mehr als die Hälfte der Erwachsenen zwischen 35 und 65 Jahren waren demzufolge übergewichtig oder adipös. Neue Daten zeigten, dass zwischen 1988 und 1994 in den USA 20 % aller Männer und 25 % aller Frauen fettleibig waren [2]. Es wird eine deutliche Steigerung der Prävalenz in den nächsten Jahren weltweit erwartet.

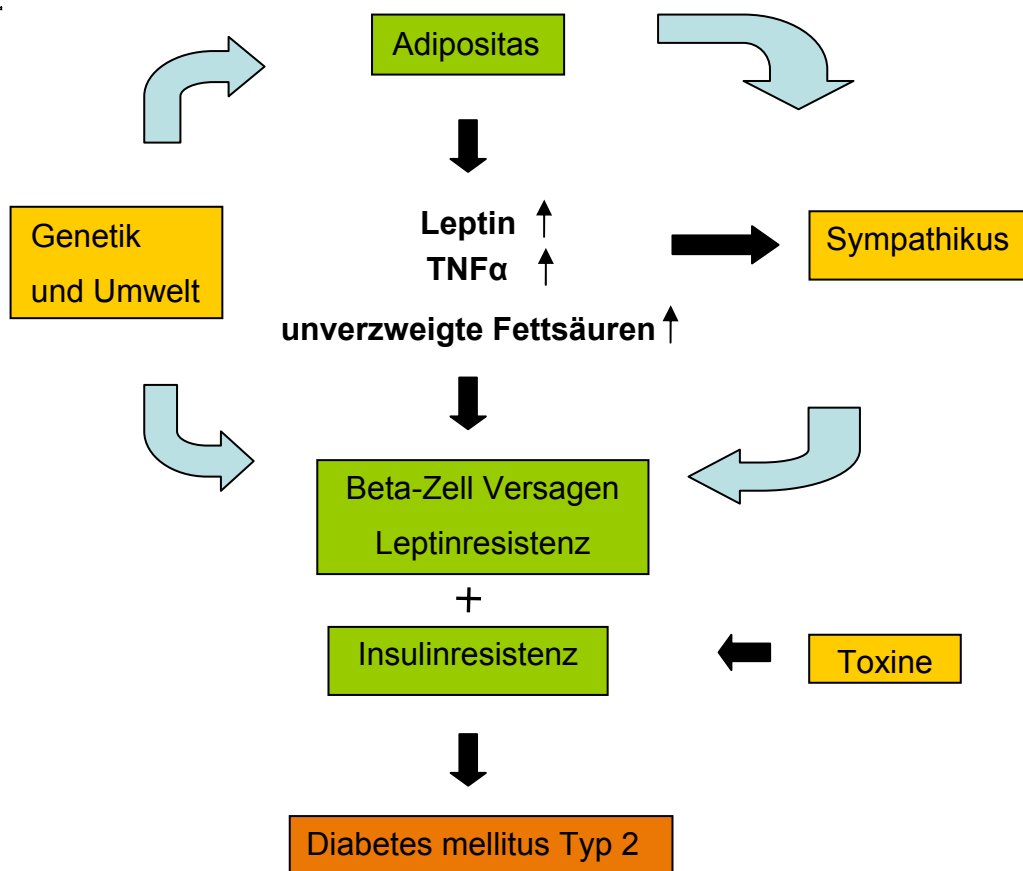
Insbesondere konnte eine Steigerung der Adipositas im Kindesalter beobachtet werden [3]. In Deutschland ist inzwischen jedes fünfte Kind übergewichtig. Dabei sind die Sekundärerkrankungen der Adipositas bedeutend für die Prognose der Patienten. Zahlreiche Studien beschreiben den Zusammenhang zwischen Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2, Schlaganfall, arterieller Hypertonie, koronarer Herzkrankheit, thrombotischen Komplikationen, Schlafapnoesyndrom, Cholelithiasis, Arthrosen und Tumorerkrankungen (z.B. Kolon-, Rektum-, Endometrium-, Mamma- und Prostata-Karzinom) [4]. Dieser Zusammenhang wird insbesondere im Rahmen des metabolischen Syndroms deutlich [5-7]. Die Nurses Health Study berichtete 1995, dass das Risiko für den Diabetes mellitus Typ 2 bei einem BMI von 30 achtundzwanzigfach erhöht ist [8]. Man geht davon aus, dass die Kosten, welche aufgrund der steigenden Prävalenz des Übergewichtes entstanden, im Jahr 2000 etwa 2-7 % des Gesundheitsetats ausmachten [9-11].

Die Prävalenz des Diabetes mellitus Typ 2 nahm ebenfalls in den letzten Jahren zu. Im Jahr 2000 gab es weltweit etwa 171 Millionen Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2. Dabei betrug das Lebenszeit-Risiko für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 in den USA im Jahr 2000 für Frauen 32,8 % und für Männer 38,5 % [12, 13].

Der Zusammenhang zwischen Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 soll im Folgenden näher betrachtet werden.

## Einleitung

Allgemein geht man davon aus, dass bei der Entwicklung der Adipositas eine vermehrte Bildung freier Fettsäuren zu einer gesteigerten Glukoneogenese der Leber und zu einer Dyslipoproteinämie führen. Dies führt zu einer Hyperinsulinämie, welche durch die Entwicklung einer Insulinresistenz an den peripheren Organen unterstützt wird. Zunächst ist die Beta-Zelle des endokrinen Pankreas in der Lage, durch eine vermehrte Insulinproduktion die metabolische Störung zu kompensieren. Im Verlauf kommt es zum Versagen der Funktion der Beta-Zelle und zur Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 2 [14-16] (Abb. 1).



**Abbildung 1:** Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 im Zusammenhang mit Adipositas [17].

Inzwischen geht man jedoch von einer multikausalen Ätiologie des Diabetes mellitus Typ 2 aus.

## 1.2 Kandidatengene für Diabetes mellitus Typ 2 und Adipositas

Genetische Studien haben kürzlich eine Reihe von Genen identifiziert, die als Kandidatengene für die Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 2 bzw. für die Entstehung von Adipositas eine Rolle spielen [18-21].

Besonders im Rahmen des Humanen-Genom-Projektes (HUGO) und Studien an ethnischen Gruppen, die zu Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 neigen, wie Pima-Indianer, Kaukasier, Maori u.a. wurde deutlich, dass es sich bei beiden Erkrankungen um polygene Mechanismen handelt [22, 23].

Zum einen gibt es vererbte Formen des Diabetes mellitus Typ 2, deren Häufigkeit mit 0.1-1 % beziffert wird. Dazu gehört beispielsweise das MELAS-Syndrom (mitochondriale Enzephalopathie, Laktatazidose, Muskelschwäche, Hemiparese) und das Wolfram-Syndrom (Diabetes insipidus, Diabetes mellitus Typ 2, Taubheit, Optikusatrophie). Diese Formen sind u.a. durch Mutationen im mitochondrialen Genom verursacht. Dabei ist besonders eine Mutation in der tRNA für Leuzin häufig beobachtet worden [19].

Des Weiteren gibt es autosomal dominant vererbte Diabetes-Formen, die als MODY („maturity-onset diabetes of the young“) bezeichnet werden.

Bei MODY kommt es aufgrund einer Mutation zu einer Störung der Insulinsekretion und dadurch zu der Entwicklung eines Diabetes.

Es handelt sich um monogenetische Mutationen in Genen für Transkriptionsfaktoren, die in der Beta-Zelle des endokrinen Pankreas exprimiert werden (Tab 1) [24].

<b>Gen</b>	<b>MODY-Typ</b>
HNF-4 $\alpha$	MODY 1
Glukokinase	MODY 2
HNF-1 $\alpha$	MODY 3
Insulin Promotor Faktor 1	MODY 4
HNF-1 $\beta$	MODY 5
NeuroD1/BETA2	MODY 6

**Tabelle 1:** Mutationen in Genen der Beta-Zelle, die zur MODY Ausbildung führen.



## Einleitung

Für die Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 2 wurde in Untersuchungen der Anteil eines genetischen Hintergrundes mit 26-58 % errechnet. Sind beide Eltern betroffen, so liegt die Wahrscheinlichkeit für die Kinder bei 70 %, ebenfalls an einem Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken [12, 13, 19].

Genomweite Linkage-Studien identifizierten Loci auf den Chromosomen 1q, 5q, 8p, 10q, 12q und 20q als Orte potentieller Kandidatengene für die Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 2 (Abb.2), wie z.B. die Gene für Leptin und den Leptin Rezeptor [18, 19].

Polymorphismen im Gen NIDDM1 auf Chromosom 2q37 für Calpain 10 sind in unterschiedlichen Populationen mit der Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert. Dabei ist die Funktion von Calpain 10 noch ungeklärt [25, 26].

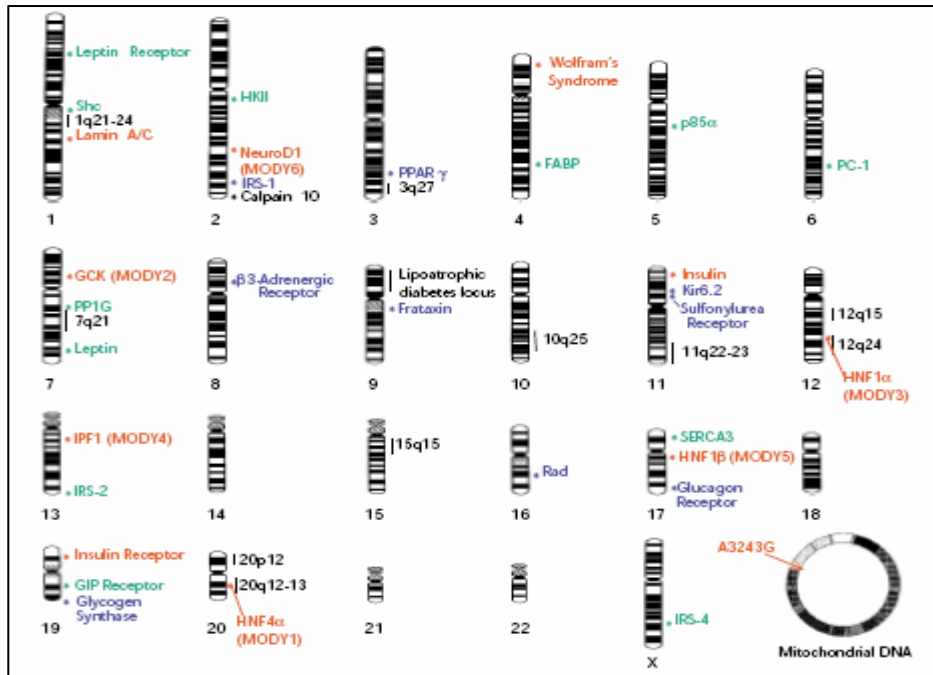
Des Weiteren wurden Mutationen im Gen PPAR- $\gamma$  beschrieben, die zu der Ausbildung eines Diabetes mellitus Typ 2, Bluthochdruck und Lipodystrophien führten [27].

Ebenfalls sind Mutationen im Gen für PP-1G (PPP1R3), eine regulatorische Untereinheit der Protein Phosphatase 1 (PP-1), mit Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert [19, 28, 29].

Schließlich wurde eine Assoziation von den Varianten Pro12Ala des Gens für PPAR $\gamma$  und Glu23Lys des Gens Kir6.2, eines ATP abhängigen Kaliumkanals, in verschiedenen Populationen mit der Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen [29-31].

Insgesamt geht man nach bisherigen Erkenntnissen davon aus, dass die Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 2 aus einer Wechselwirkung zwischen einem polygenen Hintergrund mit einem pro-diabetogenen Metabolismus und einem unterstützenden Lebensstil verursacht wird.

## Einleitung



**Abbildung 2:** Potentielle Kandidatengene für die Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 2 [21].

Für die Entwicklung der Adipositas zeigt sich ein ähnliches heterogenes Bild. Zwillingsstudien wiesen nach, dass das Gewicht sowie das individuelle Risiko für Adipositas zu 40 – 70 % vererbt bzw. von einem familiären genetischen Hintergrund beeinflusst wird [32, 33].

Adipositas tritt im Rahmen von Syndromen auf, wie beispielsweise beim Prader-Willi [34], Cohen- [35], Alstrom- [36], Bardet-Biedl- [37] oder Borjeson-Forssman-Lehmann-Syndrom [38].

Des Weiteren sind beim Menschen Mutationen in Genen beschrieben worden, die zu einer Entwicklung einer frühmanifesten Adipositas führen. Dabei handelt es sich zu einem großen Teil um Gene des Melanokortin-Signalweges, der besonders für die zentrale Regulation des Körpergewichtes im Hypothalamus Bedeutung hat [39].

Bei etwa 4-6 % der Patienten mit massiver Adipositas wurde eine Mutation im MC-4 Rezeptorgen nachgewiesen. Hierbei besteht eine Hyperphagie mit der Ausbildung einer frühmanifesten Adipositas, Hyperinsulinämie bereits vor dem Auftreten des Übergewichtes und vermehrtes Körperwachstum [40, 41].

## Einleitung

Darüber hinaus wurden Mutationen beim Menschen in den Genen für TRKB [42], PC1 [43] und POMC [44-46] beschrieben, die zu einer Ausbildung von Adipositas führen.

Menschen mit einer Mutation im POMC Gen entwickeln rötliche Haare, blasse Haut, ACTH-Mangel, Akzeleration des Knochenalters und eine frühmanifeste Adipositas [44].

Abgesehen von diesen genetischen Ursachen beim Menschen, wurden in Tiermodellen weitere Gene identifiziert, die zu einer Ausbildung von Adipositas führen.

*A<sup>v</sup>*-knock-out Mäuse, einem Gen des Melanokortin Antagonisten Agouti-related Peptide, entwickelten Übergewicht, gesteigertes Wachstum und gelbe Haarfarbe [47-49]. *Mc4r*- und *POMC*- knock-out Mäuse sind adipös und entwickeln metabolische Störungen [50, 51].

Knock-out Modelle für das *tubby* Protein [52], ein potentieller Transkriptionsfaktor im Hypothalamus, und das *fat*-Gen [53], welches für die Carboxypeptidase E kodiert, bilden ebenfalls eine massive Adipositas aus.

Aufgrund dieser Untersuchungen geht man bisher von einer polygenen Ursache für die Entwicklung einer Adipositas aus.

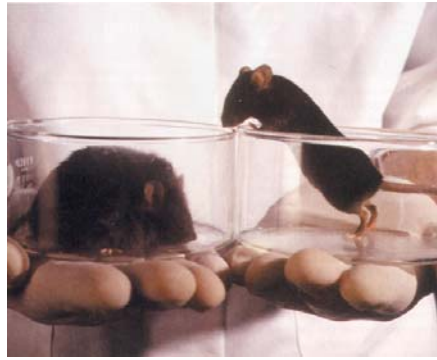
### 1.3 Leptin und die Regulation des Körpergewichts

Eine autosomal rezessive Mutation im *ob*-Gen wurde 1950 zum ersten Mal bei der *ob/ob*-Maus beschrieben [54, 55]. Dieses Mausmodell entwickelte eine Adipositas, Hyperinsulinämie, Hyperglykämie und einen Diabetes mellitus Typ 2.

Friedmann identifizierte 1996 das Hormon Leptin als Produkt des *ob*-Gens durch positionelle Klonierung (positional cloning) [56].

Der Name Leptin leitet sich dabei vom griechischen Wort für „dünn“ leptos ab. Nach Injektion von rekombinantem Leptin in Leptin defiziente *ob/ob*-Mäuse (Abb.3), reduziert sich das Gewicht und die Hyperphagie deutlich, und der Energieverbrauch steigt an [57-59].

## Einleitung



**Abbildung 3:** *ob/ob*-Mäuse als Tiermodell für die Entwicklung von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 [60].

Das 16 kDa große Protein Leptin wird hauptsächlich im Fettgewebe [56] produziert und sezerniert, wobei es auch zu einem geringeren Anteil im Magenepithel [61], Plazenta [62], Muskel [63] und ZNS [64, 65] exprimiert wird.

Leptinplasmakonzentrationen beim Menschen sind direkt proportional zur Fettmasse. Sie liegen bei Normalgewichtigen zwischen 7,5 – 9,3 ng/ml und bei Übergewichtigen zwischen 24,1 – 31,3 ng/ml. Die Leptinsekretion ist in der Nacht gesteigert und bei Nahrungskarenz vermindert [66-69].

Des Weiteren wirkt Leptin auf die Kontrollzentren der Gewichtsregulation und der Nahrungsaufnahme in den Kerngebieten des Hypothalamus über den Melanokortin-Signalweg. Leptin aktiviert im Nucleus arcuatus POMC und hemmt die Expression von NPY. Dies führt zu einer vermehrten Produktion von  $\alpha$ -MSH und  $\beta$ -MSH, welche im Nucleus ventromedialis den MC-4 Rezeptor aktivieren. Daraus resultiert eine Reduktion der Nahrungsaufnahme und eine Steigerung des Energieverbrauchs [39, 70].

Mutationen im Leptingen sind bereits beim Menschen beschrieben worden. Diese Patienten zeigen das Bild einer massiven Adipositas, Hyperphagie, vermehrte Infektanfälligkeit und einen Hypogonadotropen Hypogonadismus. Gabe von rekombinantem Leptin an diese Patienten führt zu einer Reduktion der Hyperphagie und des Körpergewichtes [71-73].

Abgesehen von der Leptinwirkung an den Zentren der Gewichtsregulation im Hypothalamus, beeinflusst Leptin die Angiogenese [74], die Hämatopoese [75], den

## Einleitung

Knochenmetabolismus [76] und das endokrine Pankreas. Darüber hinaus führt Leptin durch eine Aktivierung des Immunsystems zu einer Proliferation von T-Zellen und reguliert das Reproduktionssystem [77, 78]. In einer Studie wurde beschrieben, dass bei Frauen mit hypothalamischer Amenorrhoe durch Leptingabe die LH/FSH-Sekretion stimuliert wurde [79].

### 1.4 Die adiposinsuläre Achse

Insulin, produziert in den Beta-Zellen des endokrinen Pankreas, stimuliert die Leptinsekretion und Genexpression im Fettgewebe [80, 81].

Dieser Zusammenhang wurde in Untersuchungen an Maus- und Rattentiermodellen und beim Menschen bestätigt. Bei Patienten mit einem Insulinom sind die Leptinspiegel deutlich erhöht und normalisieren sich nach Entfernung des insulinproduzierenden Tumors [82, 83]. In Tiermodellen mit einem durch Streptozotocin induziertem Insulindefizit ist der Leptinplasmaspiegel und die Leptin-mRNA-Expression vermindert. Nach Insulingabe normalisieren sich in diesen Tiermodellen die Leptinspiegel und die Leptingenexpression in den Adipozyten [84-86].

Die Wirkung von Leptin auf die Insulinsekretion der Beta-Zelle wurde in kontroversen Studien untersucht.

In Leptin defizienten *ob/ob*-Mäusen fand man eine Hyperinsulinämie noch bevor sich die Adipositas ausbildete [54, 87, 88]. Wurden *ob/ob*-Mäuse mit Leptin behandelt, so reduzierte sich die Plasmainsulinkonzentration um 75 % nach 24 Stunden [89].

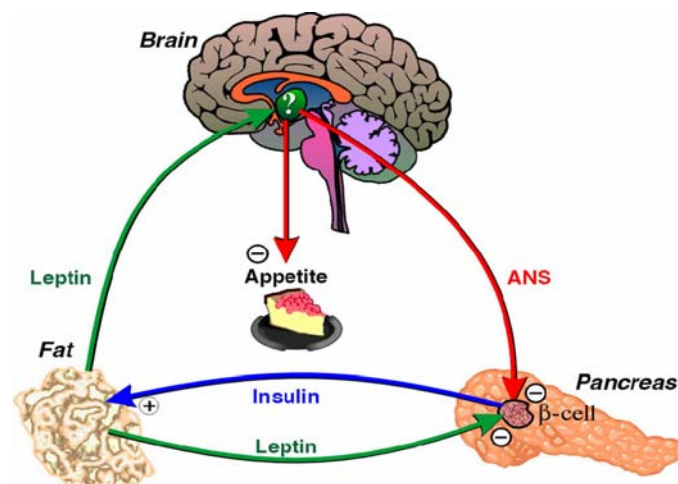


Abbildung 4: Die adiposinsuläre Achse [90].

## Einleitung

Studien an isolierten Pankeasinseln bzw. Studien an perfundiertem Pankreas von *ob/ob*-Mäusen konnten eine verminderte Insulinsekretion nach Behandlung mit 6,25-100 nM/l Leptin über 1-2 Stunden zwischen 13 und 80 % nachweisen [91, 92]. Diese Wirkung wurde bei erhöhten Glukosekonzentrationen und der Zugabe von GLP-1 reduziert [92, 93].

Darüber hinaus verminderte Leptin die durch den Proteinkinase C (PKC) Aktivator Azetylcholin stimulierte Insulinsekretion in Pankreasinseln von *ob/ob*-Mäusen [93]. Untersuchungen an verschiedenen Beta-Zelllinien zeigten unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Leptinwirkung auf die Insulinsekretion.

Eine Stimulation mit physiologischen Leptinkonzentrationen zwischen 1-20 nM/l führte zu einer Hemmung der Insulinsekretion. Bestätigt wurden diese Beobachtungen durch Studien an menschlichen Pankreasinseln und *in-vivo* Versuchen an Ratten [94-97]. In humanen Pankreasinseln wurde die Insulinsekretion bereits bei einer Leptinkonzentration von 0,01 nM/l inhibiert [98-100].

Die Präproinsulin-mRNA-Expression wurde ebenfalls durch Leptin gehemmt. Dies konnte an Ratteninselzellen [95, 101], Maus  $\beta$ TC6 Zellen [101], *ob/ob*-Mausinselzellen [94], Ratten INS-1 Beta-Zellen [89] und an humanen Pankreasinselzellen [94] nachgewiesen werden.

Injizierte man 1  $\mu$ g pro g Körpergewicht Leptin intraperitoneal in *ob/ob*-Mäuse, so reduzierte sich die Präproinsulin mRNA-Expression um 40 % nach 24 Stunden [89]. In humanen Inselzellen wurde die Proinsulin mRNA-Expression durch Leptin (6,25 nM/l) bei einer Konzentration von 11,1 mM/l Glukose aber nicht bei 5,6 mM/l Glukose über 24 Stunden um 25 % inhibiert [94]. Darüber hinaus hemmte Leptin (6,25 nM/l) die GLP-1 stimulierte Präproinsulin mRNA-Expression bei 11,1 mM/l und 5,6 mM/l Glukose in humanen Inselzellen nach 16 Stunden um 80 % [89].

In Ratten INS-1 Beta-Zellen inhibierte Leptin (0,625 nM/l bzw. 6,5 nM/l) nach 16 Stunden die Präproinsulin mRNA-Expression bei einer Glukosekonzentration von 25 mM/l [89]. Bei niedrigeren Glukosekonzentrationen von 5,6 mM/l und 11,1 mM/l wurde keine Wirkung von Leptin auf die Präproinsulin mRNA-Expression beobachtet [89].

Diese Ergebnisse verdeutlichen insgesamt eine Abhängigkeit der Leptin induzierten Hemmung der Präproinsulin-mRNA-Expression von der Glukosekonzentration und der Dauer der Leptinstimulation [90, 102].

## Einleitung

Untersuchungen mit Luziferase-Reportergenassays mit einem Konstrukt von 450 Basenpaaren des Ratteninsulinpromotors in INS-1-Ratten-Beta-Zellen, konnten eine Hemmung der Insulinpromotoraktivität um 50 % bei 25 mM/l Glukose durch Leptin (6,25 nM/l) nachweisen. Bei niedrigeren Glukosekonzentrationen (5,6 nM/l) wurde die Promotoraktivität durch Leptin nicht gehemmt [89].

Nach einer Stimulation mit GLP-1 (10 nM/l) hemmte Leptin (6,25 nM/l) die Insulinpromotoraktivität in INS-1 Beta-Zellen bei 11,1 mM/l Glukose [89]. Insgesamt beobachtete man primär eine Leptin induzierte Hemmung der Insulinpromotoraktivität in INS-1 Beta-Zellen nach einer Stimulation mit hohen Glukosekonzentrationen (25 mM/l) oder GLP-1 [89].

Die Beobachtungen, dass Insulin die Leptinsekretion stimuliert und Leptin auf der anderen Seite die Insulinsekretion, die Präproinsulin-mRNA-Expression sowie die Ratteninsulinpromotoraktivität hemmt, führten zu der Hypothese einer adipoinsulären Achse zwischen dem Fettgewebe und dem endokrinen Pankreas [90].

Es wurde postuliert, dass aufgrund dieses Regelkreises eine Regulation und Anpassung der Insulinsekretion an den Metabolismus des Fettgewebes stattfindet [90].

### 1.5 Leptin-Signalübertragung

Die Wirkung von Leptin wird über den Leptinrezeptor vermittelt. Dieser wurde erstmals aus dem Plexus choroideus der Maus isoliert und über positionelle Klonierung (positional cloning) identifiziert [103]. Es gibt fünf alternative Splicevarianten der mRNA, die für fünf verschiedene Isoformen des Leptinrezeptors (ObRa – ObRf) kodieren. Der überwiegende Teil der Leptinwirkung wird dabei über die so genannte lange Form des Leptinrezeptors ObRb vermittelt, der vor Allem im Hypothalamus und in der Beta-Zelle des endokrinen Pankreas exprimiert wird [104]. *db/db*-Mäuse, mit einer Mutation im Gen für die lange Form des Leptinrezeptors (ObRb), entwickeln Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 [54, 88, 104, 105]. Auch beim Menschen sind Mutationen im Leptinrezeptorgen bekannt. Diese führen zu der Entwicklung von Adipositas und Hyperphagie [71, 72].

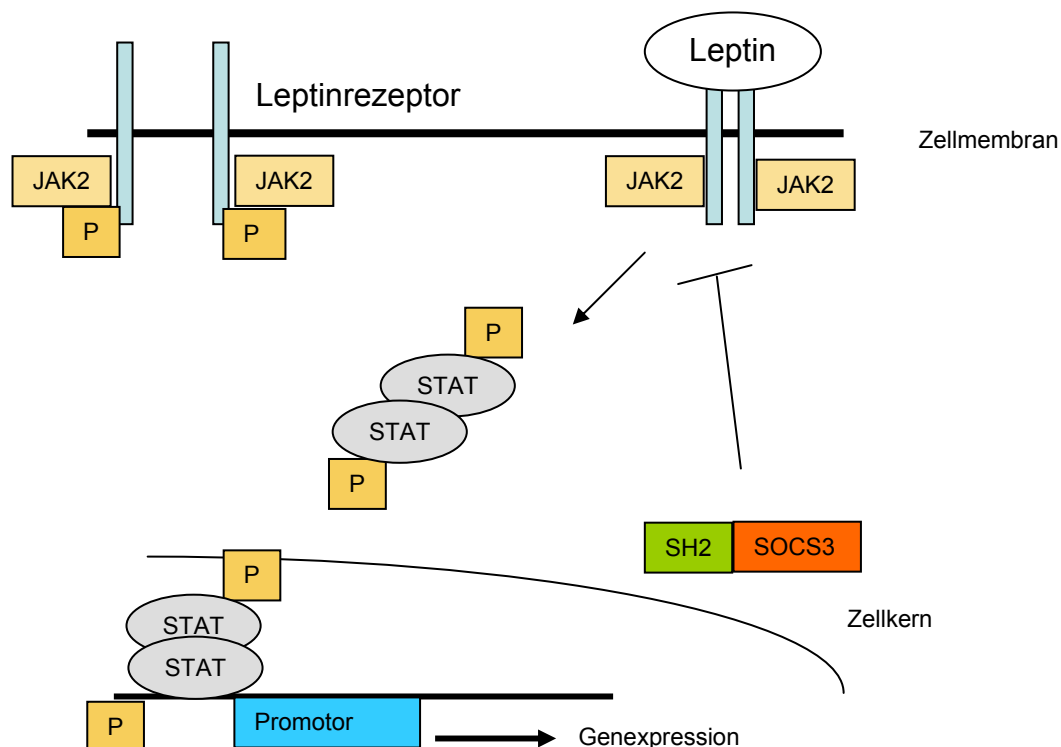
## Einleitung

Leptin bindet an den zur Zytokinfamilie Klasse 1 gehörenden Leptinrezeptor und aktiviert auf diese Weise die Janus-Kinase 2 (JAK 2) [106]. Diese ist in der Lage den Leptinrezeptor ObRb zu phosphorylieren. Dadurch werden STAT Proteine (Signal transducer and activator of transcription) aktiviert, welche sich von ihrer Bindung am Leptinrezeptor lösen und dimerisieren.

Diese Dimere gelangen in den Nukleus und können dort spezifische responsive DNA Sequenzen auf Promotoren verschiedener Zielgene beeinflussen und so die Genexpression regulieren. Dieser JAK/STAT-Signalweg für Leptin wurde im Hypothalamus beschrieben [107, 108].

In der Beta-Zelle des endokrinen Pankreas aktiviert Leptin ebenfalls den JAK/STAT Signalweg [109].

Über die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges wird darüber hinaus SOCS3 (suppressor of cytokine signalling) reguliert. Dieses Protein enthält eine SH 2 Domäne (src homology region 2 domain), mit der sie direkt an JAK2 am Leptinrezeptor bindet und auf diese Weise die JAK/STAT Signalkaskade hemmt (Abb. 5) [110, 111].



**Abbildung 5:** Jak/STAT Signalkaskade



## Einleitung

Die Insulinsekretion in Beta-Zellen des endokrinen Pankreas wird durch verschiedene Signalwege reguliert.

Dabei führt ein Stimulus der Insulinsekretion wie beispielsweise Glukose zu einer Inaktivierung von Kaliumkanälen und zu einer Depolarisation der Beta-Zelle und einer Aktivierung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen. Es kommt zu einem Kalziumeinstrom in die Zelle und zur Insulinsekretion [112-114].

Zusätzlich führt ein Stimulus über eine Aktivierung von cAMP und Proteinkinase A (PKA) [115], sowie Phospholipase C und Proteinkinase C (PKC) zu einer Induktion der Insulinsekretion [116].

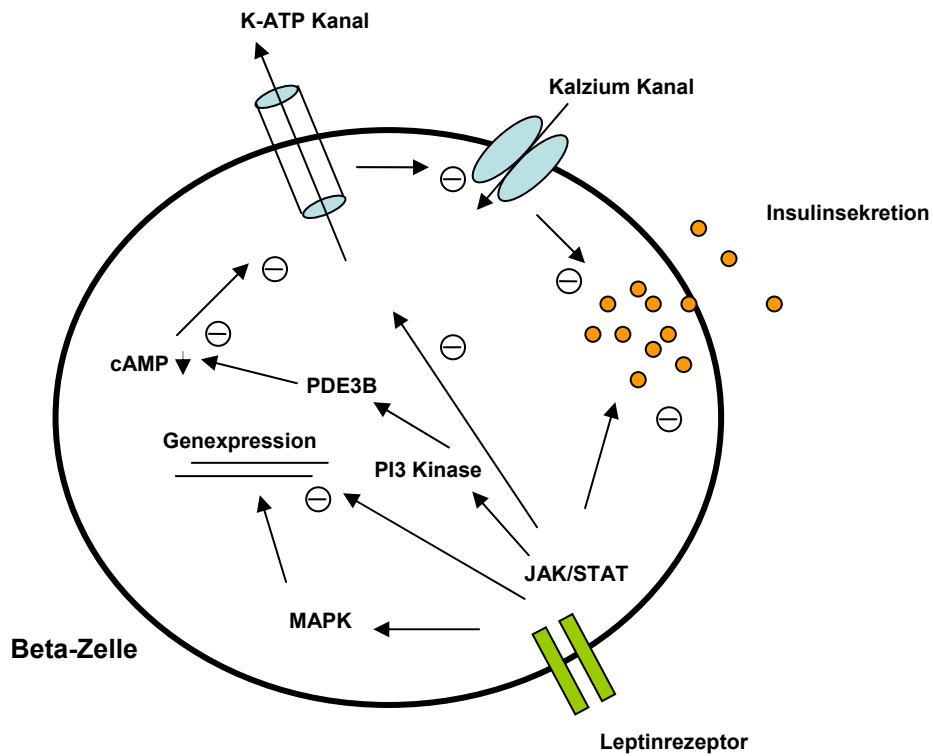
Die hemmende Wirkung von Leptin auf die Insulinsekretion wird durch Regulation unterschiedlicher Signalwege vermittelt.

Leptin aktiviert über eine Stimulation der Phosphoinositol-3-Kinase eine Phosphodiesterase 3B (PDE3B). Diese reduziert die cAMP Konzentration der Beta-Zelle und hemmt die Insulinsekretion der Beta-Zelle.

Diese Regulation wurde nachgewiesen durch Untersuchungen an HIT-T15 Zellen. Hier aktivierte Leptin (2 nM) die PI-3 Kinase um das Dreifache [117]. Des Weiteren inhibierte Leptin die GLP-1 induzierte Stimulation der cAMP-Konzentration. Diese Wirkung wurde durch Zugabe von Wortmannin, einem PI 3-Kinase Inhibitor, aufgehoben [117].

Abgesehen von der cAMP-Konzentration werden auch Kaliumkanäle der Beta-Zelle durch Leptin (1-10 nM/l) reguliert. In elektrophysiologischen Patch-clamp Untersuchungen an Beta-Zellen von Wildtyp und *ob-ob* Mäusen wurden ATP sensitive Kaliumkanäle durch Leptin geöffnet [92]. Dies führte zu einer Reduktion des Kalziumeinstroms und dadurch zu einer verminderten Insulinsekretion der Beta-Zelle. In CRI-G1 Zellen war diese Öffnung der Kaliumkanäle durch Leptin nach Zugabe von Insulin reversibel [118, 119].

## Einleitung



**Abbildung 6:** Leptin vermittelte Signalwege in der Beta-Zelle des endokrinen Pankreas.

Zusätzlich aktivierte Leptin in MIN6 Zellen die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK). Diese Wirkung konnte allerdings in Untersuchungen an Pankreasinselnzellen der Ratte nicht bestätigt werden [109, 114, 120].

Insgesamt reguliert Leptin, nach der Bindung an den Leptinrezeptor, zahlreiche Proteine, die zum einen die Insulingenexpression und zum anderen direkt die Insulinsekretion beeinflussen (Abb.6) [90, 111].

## **1.6 Zielsetzung der Arbeit**

Leptin, sezerniert vom Fettgewebe, reduziert die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch in den Kerngebieten des Hypothalamus. Mutationen im Gen für Leptin und den Leptin-Rezeptor führen bei Mäusen und Menschen zu der Entwicklung einer massiven Adipositas und der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 [32].

Darüber hinaus hemmt Leptin die Insulinsekretion der Beta-Zelle des endokrinen Pankreas. Umgekehrt fördert Insulin die Leptinsekretion der Adipozyten. Auf diese Weise entsteht eine adipoinsuläre Achse zwischen dem Fettgewebe und dem endokrinen Pankreas.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Gene in der Beta-Zelle des endokrinen Pankreas zu identifizieren und zu charakterisieren, durch deren Regulation die hemmende Wirkung von Leptin auf die Insulinsekretion vermittelt wird.

Auf diese Weise sollten neue Einblicke im Bezug auf die Beta-Zell Regulation durch Leptin ermöglicht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Absaugpumpe	Hartenstein, Würzburg
Agarose-Gel-Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad-System, Hercules CA
Autoklav	Melag, Berlin
β-Counter	Beckmann, Osterode
Biofuge 28 RS	Heraeus, Sepatech, GmbH, Osterode
Brutschrank	Heraeus, Sepatech, GmbH, Osterode
Digital-Kamera	Kodak, Stuttgart
DNA-Sequenzierer	ABI 310; Perkin Elmer, Shelton CT
Falcon tubes	Becton Dickinson, Franclin Lakes NJ
Filmentwickler Optimax	Protec, Oberstenfeld
Fluoreszenzmikroskop; Axioskop 20	Carl Zeiss, Göttingen
Geldokumentationsanlage	Serva, Heidelberg
Heizblock	Eppendorf, Engelsdorf
Heizofen	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
Hybridisierungsöfen 7601	GFL, Burgwedel
Kryo vials (21,8 ml)	Greiner, Longwood FL
Kunststoffküvetten	Hartenstein, Würzburg
Laminar-Flow-Arbeitsbank	Heraeus Sepatech GmbH Osterode
Magnetfish	Hartenstein, Würzburg
MIKROTITER®-Platten-Photometer	Dynatech, Jefferson, NY
pH-Meter digital	WTW, Weilheim
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Protein-Gel-Elektrophorese-Kammer,	BioRad, Hercules CA
Sequenzierer (Abi 310)	Perkin Elmer, Shelton CT
System Luminometer 400	Dynatech, Jefferson, NY
Thermo-cycler (GeneAmp PCR System 9700)	Perkin Elmer, Shelton CT
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg

## Material und Methoden

### Geräte

Ultrazentrifuge L7-55  
Vortex genie 2  
Zentrifuge ROTANDA/RFC  
Zentrifuge Beckmann (CH ANJ25)

### Firma

Beckmann, Osterode  
Scientific Industries, Bohemia, NY  
Hettich, Tuttlingen  
Beckmann, Osterode

## 2.2 Chemikalien

### Artikel

Azeton  
Agarose, ultra select  
Ampicillin  
Amoniumperoxidisulfat  
ATP  
[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]  $\alpha$ -ATP  
Bacto-Agar  
Benzamidin  
 $\beta$ -Glycerolphosphat  
BigDye™ Mix  
Borsäure  
Bromphenolblau  
BSA  
DNA Ladder READY LOAD® 100 bp  
DNA Ladder READY LOAD® 1Kb  
dNTP (10 mM)  
DTT 0,1 M  
EDTA  
Ethanol (100 %)  
Ethidiumbromid

### Firma

Roth, Karlsruhe  
Roth, Karlsruhe  
Roth, Karlsruhe  
Roth, Karlsruhe  
Sigma, München  
Hartmannn Analytics, Braunschweig  
Sigma, München  
Sigma, München  
AppliChem, Darmstadt  
Perkin Elmer, Wellesley, MA  
Sigma, München  
Invitrogen, Life Technolgies, Paisley  
Sigma, München  
Invitrogen, Life Technolgies, Paisley  
Invitrogen, Life Technolgies, Paisley  
TaKaRa, Shiga Japan  
Invitrogen, Life Technolgies, Paisley  
Sigma, München  
Sigma, München  
Sigma, München

## Material und Methoden

### Artikel

G50 fine Sephadex®  
Glycogen  
First strand buffer 5x  
Formaldehyd (mind. 35 %)  
Formamid  
Fura 2/AM  
Glukagon  
Glycerol  
H<sub>2</sub>O  
Imidazol  
Insulin  
KCl  
Koffein  
MgCl<sub>2</sub>  
MOPS  
NaCl  
NaOH (12,5 N)  
Leptin  
Oligo (dT)<sub>12-18</sub> (0,5 µg/µl)  
Phenol/Chloroform (3:1)  
Phosphorylase b  
Phosphorylase Kinase  
Pluronic F-127  
Pp-1α antibody  
2-Propanol  
SDS  
Secretogranin II antibody rabbit  
Trizol  
Temed

### Firma

Sigma, München  
Invitrogen, Life Technolgies, Paisley  
Invitrogen, Life Technolgies, Paisley  
Amershan Pharmacia, Uppsala S  
Invitrogen, Life Technolgies, Paisley  
Molecular Probes, Inc., Eugene OR  
Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz  
Sigma, München  
Delta-Pharma, Pfullingen  
Roth, Karlsruhe  
Delta Pharma, Pfullingen  
Merck, Darmstadt  
Sigma, München  
Sigma, München  
Sigma, München  
Sigma, München  
Sigma, München  
R&D systems, Inc Minneapolis MN  
Invitrogen, Life Technolgies, Paisley  
Sigma, München  
Sigma, München  
Sigma, München  
Molecular Probes, Inc., Eugene OR  
Exalpha Biologicals, Boston MA  
Sigma, München  
Invitrogen, Life Technolgies, Paisley  
QuedBioscience, San Diego CA  
Invitrogen, Life Technolgies, Paisley  
Sigma, München

### 2.3 Enzyme

#### Enzym

SUPER SCRIPT™II

TaKaRa Ex Taq™

Pfu Polymerase

DNase I (10 U/μl)

RNAse Inhibitor (40 U/μl)

#### Firma

Invitrogen, Life Technologies, Paisley

Takara, Shiga, Japan

Promega, Madison WI

Invitrogen, Life Technologies, Paisley

Invitrogen, Life Technologies, Paisley

### 2.4 Kits

#### Kit

AutoSeq™G50

ECL Western Blotting Detection Kit

QIAquick-Gel-Extraktion-Kit (RPM)™

Rapid-Pure-Miniprep-Kit (RPM)™

Rapid-Pure-Mini-Monsterprep (RPM4G)™

TOPO™ TA Cloning Kit

Advantage™-HF PCR Kit

Advantage™-HF 2 PCR Kit

Advantage™-GC PCR Kit

Advantage™-KlenTaq Polymerase Mix

PCR-Select™-cDNA Subtraction Kit

#### Firma

Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala

Qiagen, Hilden

Qiagen, Hilden

Qiagen, Hilden

Qiagen, Hilden

Invitrogen, Life Technologies, Paisley

Clontech, Palo Alto, CA

Clontech, Palo Alto, CA

Clontech, Palo Alto, CA

Clontech, Palo Alto, CA

Clontech, Palo Alto, CA

## 2.5 DNA Oligonukleotide

Die DNA Oligonukleotide wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, S) hergestellt.

### **STAT-1** (210 Bp) rattus norvegicus (AF205604)

sense 5'-TGAACTCCATCGAGCTCACTCAGAACAAC-3'

antisense 5'-AGAGGACGAAGGTGCGATCGGATAAC-3'

### **STAT-2** (108 Bp) rattus norvegicus (NM\_001011905)

sense 5'-GAAGGGGGCATTACTTGTTCTTGGGTGGAG-3'

antisense 5'-GCGGATGATCTCTGCCAGTGGGAGTGAC-3'

### **STAT-3** (520 Bp) rattus norvegicus (NM\_012747)

sense 5'-TGGAAGAGGCGGCAGCAGATAGC-3'

antisense 5'-GCACGGCCCCCATTCCCACAT-3'

### **STAT-4** (1500 Bp) rattus norvegicus (AF055291)

sense 5'-AAACTATGGCAATTCTCCTTCAAAC-3'

antisense 5'-AAACTATGGCAACAATTCTCCTTCAAAC-3'

### **STAT-5a** (1150 Bp) rattus norvegicus (NM\_017064)

sense 5'-GCAACATTTCCCCATCGAGGTCCGGCACTACC-3'

antisense 5'-GTGGCCTGGCCTCGGTCCTGGGGATTG-3'

### **STAT-5b** (200 Bp) rattus norvegicus (NM\_022380)

sense 5'-GCCAGCATTTCCCCATCGAGGTGCGACATTATTTA-3'

antisense 5'-GTCATACGTGTTCTGGAGCTGCGTGGCATAGTGC-3'

### **STAT-6** (332 Bp) rattus norvegicus (AF055292)

sense 5'-CCAGCCGGGGACTGCTACCAGAACAACACTTC-3'

antisense 5'-CCGGATGACATGGGCAATGGTGATGC-3'

### **SOCS-3** (751 Bp) rattus norvegicus (AF075383.1)

sense 5'-GCCGCCGCCTCGTCTCG-3'

antisense 5'-CGGCGGCGGGAACTTGCTGTG-3'

### **Neuro D1** (580 Bp) rattus norvegicus (NM\_019218)

sense 5'-AAGAGACGGGGCCCCAAAAGAAAAGATGACC-3'

antisense 5'-GGCACCCGAGGAGAAGATT-3'



## Material und Methoden

### **Pan-1** (432 Bp) *mus musculus* (AF352579)

sense 5'-GCAGCGCTTACCCCTCCCCCTTCTAC-3'

antisense 5'-ACCTCCTCGTCCTCTTTCTCCTCCCGCTTGAT-3'

### **IDX-1** (337 Bp) *rattus norvegicus* (NM\_022852.3)

sense 5'-TGCTAATCCCCCTGCGTGCCTGTA-3'

antisense 5'-CTCCTCCGGTTCTGCTGCGTATGC-3'

### **ISL-1** (534 Bp) *rattus norvegicus* (NM\_017339)

sense 5'-ATGGGCGATCCACCAAAAAAAAA-3'

antisense 5'-CATCTGAATGAATGTTCTCATGCCTCTA-3'

### **INS** (620 Bp) *rattus norvegicus* (NM\_019129)

sense 5'-CCTGCCCAGGCTTTTGTCA-3'

antisense 5'-GGTGCAGCACTGATCCACAATG-3'

### **GPR 56** *mus musculus* (NM\_018882)

Cyt28-1 5'-AGACAGCGTGATCCCGGCCTCCCAC-3'

Cyt28-1.1 5'-GGCCAGCGGAACCAGACCCAACAGAGCAC-3'

Cyt28-1.2 5'-CTTCCCCGGGCGTATTCCAGCAGACC-3'

Cyt28-1.3 5'-ACTCTGGTGGCGTTGGTGGATGTGAATAA-3'

Cyt28-1.4 5'-GAAGACCCGGCATCAAGCAGCACAG-3'

Cyt28-1.5 5'-GCCCCGCTGATCGCCACCTC-3'

Cyt28-1.6 5'-GTGGTACTGGTCCAGAGGTTC-3'

Cyt28-a 5'-TTGTGCTGCTTTGCCATGGCATTAGATAACAG-3'

Cyt28-a1 5'-TTGCGGGGGTGGGGGTGAGGAG-3'

Cyt28-a2 5'-CTGCCGGAGCTGATGGGGAGTTTG-3'

Cyt28-a3 5'-CTGCACGACAATACCCAAGACCT-3'

Cyt28-a4 5'-GAGTCCCGGATCCAGCACATAGAG-3'

### **L1cam** (657 bp) *rattus norvegicus* (AB083352)

sense 5'-CCTTTCGGGTCCTGCCATTA-3'

antisense 5'-GCCCAAGCCCCGCCATTA-3'

### **Secretogranin II** (780 bp) *rattus norvegicus* (NM\_022669)

sense 5'-TTGAGAAGGTTAGTGAATGCTGTGG-3'

antisense 5'-GATGTTCCCTTCCCTGCTCTGCCTGTT-3'

### **PP-1 $\alpha$** (600 bp) *rattus norvegicus* (NM\_031527)

sense 5'-ATGATGAATGCAAGAGACGATACAACA-3'

antisense 5'-TGGGGCAGAGGGCAGCACA-3'

### 2.6 Zelllinien

#### 2.6.1 INS-1-Zellen

INS-1 Zellen sind insulinproduzierende, glukoseresponsive Beta-Zellen der Ratte, die aus einem mit Röntgenstrahlen induzierten Insulinom gewonnen wurden. Etabliert wurde diese Zelllinie von Claes Wollheim [121, 122]. Die Verdopplungszeit dieser adhären wachsenden Zelllinie beträgt 100 Stunden.

#### 2.6.2 Hep-G2 Zellen

Die Hep-G2 Zellen, eine humane Leberzelllinie, entstanden aus einem hepatozellulärem Karzinom. Es handelt sich um adhären wachsende Zellen mit einer Verdopplungszeit von 50-60 h [123].

#### 2.6.3 Zellkulturmedien

INS-1 Medium:

- 500 ml RPMI 1640 Gibco™ (Kat.Nr. 32404-014, mit 11.1 mM Glukose)
- 50 ml FBS (hitzenedenaturiert)
- 5.6 ml Natrium Pyruvat (1mM)
- 5.6 ml Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml, 10 mg/ml) 1%
- 5 ml L-Glutamin (2 mM) 1%
- 0.560 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol (50 mM)

Es wurde diskutiert, ob BSA die Leptinwirkung beeinflusst. Aus diesem Grunde wurde während der Leptinstimulation serumfreies Medium verwendet [121].

Serumfreies INS-1 Medium für Stimulationsversuche:

- 500 ml RPMI 1640 Gibco™ (Kat.Nr. 32404-014, mit 11.1 mM Glukose)
- 5.6 ml Natrium Pyruvat (1 mM)
- 5.6 ml Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml, 10 mg/ml) 1%
- 5 ml L-Glutamin (2 mM) 1%
- 0.16 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol (50 mM)
- 1 % BSA
- 1% Trasylol

## Material und Methoden

### Hep-G2 Medium:

- 500 ml DMEM/F12 Medium Gibco™ (Kat.-Nr. 21041-025, mit L-Glutamin 2 mM, 4 mg/l Pyridoxin-HCl)
- 50 ml FBS (hitzenedenaturiert)
- 5,6 ml HEPES buffer (10 mM) 1%
- 5 ml Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml, 10 mg/ml) 1%

### Serumfreies Medium für Stimulationsversuche:

- 500 ml DMEM/F12 Medium Gibco™ (Kat.-Nr. 21041-025, mit 2 mM L-Glutamin, 4 mg/l Pyridoxin-HCl)
- 560 µl HEPES buffer (10 mM) 1%
- 500 µl Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml, 10 mg/ml) 1%
- 500 µl Trasylol 1%
- 0,05 g BSA (in 500 µl Medium gelöst)

### 2.6.4 Zellzählung

Zur Zellzählung wurden in INS-1 Medium resuspendierte Zellen in einem Eppendorfcap® im Verhältnis 1:1 mit 0,5 % Trypanblau versetzt. Auf diese Weise färbten sich die abgestorbenen Zellen mit blauem Farbstoff an und konnten von den intakten Zellen differenziert werden.

In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Gesamtzahl der Zellen nach folgender Formel berechnet:  $\text{Zellzahl} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl/ml Medium}$ .

### 2.6.5 Passagieren von Zellen

Bei Konfluenz der Zellen wurde das Medium entfernt und 4 ml Trypsin EDTA zugegeben, um die Zellen zu lösen.

6 ml RPMI Medium wurde hinzugegeben und die Zellen abgespült. Sie wurden in ein 50 ml Falcon-tube® überführt und bei 2000 g für 2 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen anschließend erneut in RPMI Medium aufgelöst und auf Kulturschalen gleichmäßig verteilt.

### 2.6.6 Zellstimulation

Für die Stimulationsversuche mit Leptin wurden die Zellen gleichmäßig in 10 cm Schalen ausgesät und 24 h in serumfreiem Medium gehalten. In definierten Zeitabständen wurden die Zellen mit 100 nM Leptin, welches in HCL (15 mM) und

## Material und Methoden

NaOH (7,5 mM) im Verhältnis 1:0,6 gelöst war, stimuliert. Als Kontrolle wurden gleichzeitig Zellen mit einem Vehikel, bestehend aus HCl und NaOH, behandelt. Nach 24 h wurden bei allen Zellen Medium und Leptin bzw. Vehikel erneuert. Nach Ablauf der vorgegebenen Stimulationszeit wurden die Zellen weiter verarbeitet.

### 2.7 RNA-Isolation und cDNA Synthese

#### 2.7.1 RNA Isolierung

Das Medium wurde von den Zellen entfernt, und die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Trizol<sup>®</sup> homogenisiert und entsprechend dem Protokoll des Herstellers aufgearbeitet.

Nach Auftrennen des Zelllysats mit Chloroform in RNA-, DNA- und Proteinphase, wurde die RNA mit Isopropanol und Ethanol gefällt und in 30 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

Die extrahierte RNA Konzentration wurde fotometrisch bestimmt.

#### 2.7.2 Poly-A<sup>+</sup> Isolierung (mRNA)

Die mRNA wurde mit dem Micro-FastTrack<sup>™</sup> 2.0 Kit (Invitrogen, Paisley) isoliert. Die meisten Zellen beinhalten etwa 10<sup>-11</sup> g RNA, bestehend aus 80-85 % rRNA, 15-20 % tRNA und 1-5 % mRNA.

Die mRNA besteht aus 1800 bis 5000 Basen und ist einzelsträngig. Charakteristisch ist ein so genannter „Poly A Schwanz“ am 3' Ende der Sequenz, d.h. hier besteht das Ende zum überwiegenden Teil aus Adenosinresten.

Bei der mRNA Extraktion wurde eine oligo(dT) Zellulosemembran als eine stationäre Phase verwendet. An diese konnte der Poly A Schwanz der mRNA binden.

Pro mg Zellulose wurde ~1 µg mRNA gebunden.

Zu Beginn der Extraktion erfolgte das Auflösen der Zellen in einem Lysepuffer (s.u.) mit gleichzeitigem Verdau von Proteinen und Ribonukleasen.

Dieses Lysat wurde auf die Zellulosemembran gegeben.

Nach einer Inkubation von 20 min zur Bindung der RNA an die stationäre Phase und anschließendem Pelletieren, wurde die rRNA in 3 Waschschritten entfernt, bis nur die mRNA an die Membran gebunden blieb.

In einem abschließenden Eluierungsschritt wurde diese mRNA mit Hilfe eines speziellen Waschpuffers (s.u.) von der Membran gelöst.

## Material und Methoden

Das Eluat wurde mit 10  $\mu$ l „glycogen carrier“ (3 mg/ml), 30  $\mu$ l Natriumacetat (2 M) und 600  $\mu$ l Ethanol (100 %) gefällt und in 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgelöst.

<b>Lysis buffer:</b> 200 mM NaCl	<b>Binding buffer:</b> 500 mM NaCl
200 mM Tris Cl (pH 7,5)	10 mM Tris Cl (pH 7,5)
1,5 mM MgCl <sub>2</sub>	gelöst in DEPC-H <sub>2</sub> O
2 % SDS	
Protein/Rnase Degradier	
<b>Wash buffer:</b> 250 mM NaCl	<b>Elution buffer:</b> 10 mM Tris Cl (pH 7,5)
10 mM Tris Cl (pH 7,5)	gelöst in DEPC-H <sub>2</sub> O
gelöst in DEPC-H <sub>2</sub> O	

### 2.7.3 DNase Verdau von Gesamt- und Poly(A)<sup>+</sup>RNA

Um die extrahierte RNA von DNA-Kontaminationen zu befreien, wurde ein DNase Verdau durchgeführt.

50  $\mu$ g RNA wurden 0,25  $\mu$ l RNase Inhibitor (40 U/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l DNase I (10 U/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l 0,1 M DTT und je 5  $\mu$ l von 0,1 M Tris-Chlorid (pH 8,3), 0,5 M KCl und 15 mM MgCl<sub>2</sub> zugeführt. Der Ansatz wurde mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 76  $\mu$ l aufgefüllt.

Nach einer Inkubation bei 37 °C über 30 min und Zugabe von 224  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 200  $\mu$ l Phenol/Chloroform (3:1), wurde der Ansatz, um die DNA zu extrahieren, bei höchster Geschwindigkeit für 3 min zentrifugiert. Die entstandene obere Phase wurde entnommen und mit 3 M Natriumacetat und Ethanol (100 %) über 30 min bei –80°C gefällt.

Nach 15 minütiger Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit, wurde der Überstand entfernt und erneut mit 500  $\mu$ l Ethanol (75 %) gewaschen.

Das Produkt wurde 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt und das RNA-Pellet getrocknet.

Ethanolreste wurden entfernt und die RNA in 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgelöst. Die extrahierte Menge wurde fotometrisch bestimmt und die Probe bei –80 °C gelagert.

## Material und Methoden

### 2.7.4 Reverse Transkription

Die RNA wurde mit der reversen Transkription in die komplementäre cDNA umgeschrieben.

Ein Ansatz, bestehend aus verdauter RNA und 1  $\mu$ l Oligo (dT)<sub>12-18</sub> (500 $\mu$ g/ml), wurde auf ein Gesamtvolumen von 12  $\mu$ l mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Nach 10 minütigem Erhitzen auf 70 °C im Thermo cycler<sup>®</sup> wurden 4  $\mu$ l 5X First Strand Buffer, 2  $\mu$ l 0,1 M DTT und 1  $\mu$ l 10 mM dNTP zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 2 min bei 40 °C.

Schließlich wurde 1  $\mu$ l des Enzyms Reverse Transkriptase, hier SuperScript II<sup>®</sup>, hinzugefügt, und es erfolgte eine Inkubation bei 42 °C für 50 min und eine anschließende Inaktivierung bei 70 °C für 15 min. Die entstandene cDNA wurde bei – 20 °C gelagert.

### 2.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung und Nachweis von Nukleinsäuren und wurde 1987 von Mullis [124] entwickelt.

Spezifische DNA-Sequenzen konnten so *in vitro* exponentiell amplifiziert werden.

Das Reaktionsprinzip ist aus der DNA-Replikation abgeleitet. Als Primer dienen DNA-Oligonukleotide, deren Sequenz aus den flankierenden Bereichen des zu amplifizierenden DNA Produktes rekrutiert wurden.

Durchgeführt wurde die DNA-Amplifikation mit einer hitzestabilen DNA Polymerase.

Diese wurde aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen. Das

Molekulargewicht dieser Polymerase betrug 94.000 Da, das pH Optimum lag

zwischen pH 7-8, das Temperaturoptimum bei 75-80 °C. Die Halbwertszeit betrug

130 min bei 92,5 °C. Das Enzym hatte eine Polymerisationsgeschwindigkeit von 150

Nukleotiden pro Sekunde. Diese Taq Polymerase hatte eine Fehlerrate von 180

Basen auf 10.000 Basenpaaren.

Die gesamte PCR-Reaktion verlief in 3 Teilschritten. Zunächst erfolgte die

Denaturierung, anschließend die Hybridisierung- oder Annealing der Primer und schließlich die Extension.

Die Hybridisierungstemperatur wurde jeweils an die verwendeten Primer angepasst.

## Material und Methoden

### PCR-Zyklus Parameter:

94 °C	1 min
25 – 36 Zyklen	
94 °C	0,30 min
55 °C	0,30 min
72 °C	0,45 min
72 °C	2 min
4 °C	∞

### PCR Ansatz:

- 5 µl 10x Ex-Taq-Puffer
- 4 µl dNTP (2,5 mM)
- 1 µl sense Primer (10 µg/µl)
- 1 µl antisense Primer (10 µg/µl)
- 1 µg DNA-Template
- 1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

Mit H<sub>2</sub>O wurde die Probe auf eine Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt.

Es wurde des Weiteren eine Advantage high fidelity Polymerase verwendet. Es handelte sich dabei um eine Kombination aus KlenTaq und einer „proofreading Polymerase“. Dazu enthielt diese „hot start“ Polymerase einen monoklonalen Antikörper, der sich von der Polymerase ab einer Temperatur von 60 °C löst und erst dann zu einer Aktivierung der Polymerase führte. Auf diese Weise wurde unspezifisches Ablesen bei niedrigeren Temperaturen vermieden, („Hot Start“).

<b>Advantage HF PCR</b>	<b>Advantage HF2 PCR</b>	<b>Advantage GC PCR</b>
5 µl 10x HF PCR buffer	5 µl 10x HF2 PCR buffer	5 µl 10x HF PCR buffer
5 µl HF dNTP Mix	5 µl HF dNTP Mix	5 µl HF dNTP Mix
1 µl Primer	1 µl Primer	1 µl Primer
1 µg DNA Probe	1 µg DNA Probe	1 µg DNA Probe
1 µl 50x Adv. HF	1 µl 50x Adv. HF2	1 µl 50x Adv. GC
Polymerase	Polymerase	Polymerase
38 µl H <sub>2</sub> O	38 µl H <sub>2</sub> O	38 µl H <sub>2</sub> O

PCR-Zyklus Parameter:

94 °C	15 sec
25-36 Zyklen	
94 °C	15 sec
68 °C	4 min
68 °C	8 min
4 °C	∞

Darüber hinaus wurde eine Pfu Polymerase verwendet. Sie hat etwa eine Größe von 92 kDa und wurde isoliert aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus*. Diese Polymerase hatte eine „proofreading“ Aktivität bei einer optimalen Temperatur von 75°C zur DNA Replikation.

### 2.9 Subtraktions-PCR

Die Subtraktions-PCR ist eine Möglichkeit, zwei unterschiedliche Populationen mRNA zu vergleichen und differenziell exprimierte Gene zu erkennen.

Hierfür wurden glukoseresponsive Ratten-INS-1 Beta-Zellen mit 100 nM Leptin bzw. mit einem Kontrollvehikel über 24 h behandelt. Die poly A<sup>+</sup> RNA wurde extrahiert, gepoolt und die cDNA synthetisiert.

Aus Übersichtsgründen wurde die unstimulierte cDNA „driver“ und die stimulierte cDNA, welche die unterschiedlich exprimierten Transkripte enthielt, „tester“ genannt.

Beide Gruppen von cDNA wurden mit dem Restriktionsenzym *Rsa I* verdaut.

Dadurch wurde das Binden von Adaptern zu einem späteren Zeitpunkt vereinfacht.



## Material und Methoden

Die „tester“ cDNA wurde zunächst in zwei Probenansätze geteilt.

Ein Ansatz wurde an Adapter 1 und der andere Ansatz wurde an den Adapter 2R ligiert. Da diese Adapter keine Phosphatgruppen an ihrem Ende besaßen, lagerten sie sich jeweils nur am 5'-Ende der cDNA an. Auf diesen Adaptern lagen bekannte Sequenzen, um Primerbindung in den abschließenden PCR Amplifikationen zu ermöglichen.

Zunächst fanden zwei Hybridisierungsschritte statt.

Separat wurden beide „tester“- Gruppen mit einem Überschuss an „driver“ cDNA versetzt. Auf diese Weise banden gleiche Sequenzen aneinander und bildeten Doppelstrang DNA, während die unterschiedlich regulierten Transkripte als Einzelstränge bestehen blieben.

In einem zweiten Hybridisierungsschritt, ohne vorausgehender Denaturierung, wurden nun beide „tester“ Gruppen zusammengeführt und zusätzlich mit einem Überschuss an „driver“ cDNA versetzt.

Das führte dazu, dass nur die einzelsträngige DNA hybridisieren und cDNA Doppelstränge, mit zwei unterschiedlichen Adaptern, bilden konnten.

Zwei abschließende PCR Amplifikationen dienten zur Hintergrundreduktion und Produktvermehrung. Dabei handelte es sich um eine Suppressions-PCR, d.h. konnte kein Primer an einen Adapter binden, bildete der Primer eine „pan like structure“ und es erhöhte sich die Spezifität der gesamten PCR.

Als Polymerasen wurde eine Taq Polymerase und eine hotstart KlenTaq Polymerase<sup>®</sup> eingesetzt.

Diese Subtraktion-PCR wurde zusätzlich zur Beta-Zell-DNA auch mit einer Kontrolle aus Sklettmuskulatur DNA durchgeführt. Die abschließende PCR wurden ebenfalls mit der jeweiligen unsubtrahierten „Tester“ DNA vollzogen.

Die Proben wurden mit Hilfe eines Agarosegels analysiert. Die entstandenen Banden wurden eluiert, subkloniert und sequenziert. Diese Sequenz wurde mit der NCBI-Datenbank verglichen und aufgrund ihrer Homologien identifiziert (Abb. 6).

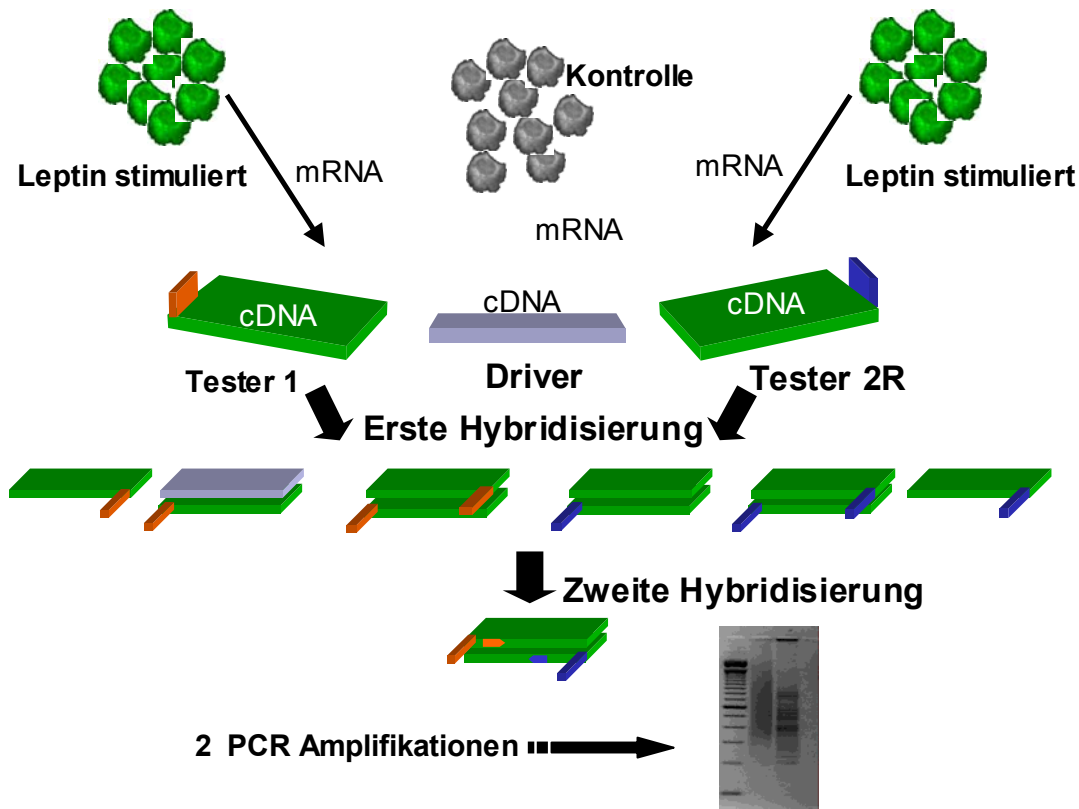


Abbildung 6 : Schematische Darstellung der Subtraktions-PCR

## 2.10 Gelelektrophorese

### 2.10.1 Agarose Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA und zur Kontrolle von PCR Produkten, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Das Prinzip besteht darin, daß eine elektrische Kraft auf ein Ion wirkt. Dieser wirkt eine Reibungskraft entgegen, die abhängig ist von Ionenlänge, sowie der Viskosität der Lösung. In einem konstanten elektrischen Feld gleichen sich die Kräfte aus und das Ion hat eine charakteristische Wanderungsgeschwindigkeit und Auftrennungsbild. Agarose wurde in TAE aufgelöst und aufgekocht. Die Konzentration der Agarose hing dabei von der Größe des zu erwartenden Produktes ab. Für eine Produktgröße von weniger als 1000 bp wurde ein 1,5 – 2 prozentiges Gel, für Produkte über 1000 bp ein 1,2 prozentiges Gel erstellt. Nach Abkühlen dieser Lösung auf etwa 60 °C wurden 5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Dann wurde die Agarose in eine horizontale Gelkammer mit Kamm etwa zu 0,5 – 1 cm gefüllt. Nach Polymerisierung des Gels wurde der Kamm entfernt, und es entstanden Taschen, in die je 10 µl der Probe, welche zuvor mit 1 µl loading buffer versetzt worden war, gefüllt wurden. Als

## Material und Methoden

Laufpuffer wurde TAE (Tris-Azetat-EDTA) verwendet. Zur Bestimmung der Produktgröße wurde ein DNA Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V. Die Probe wanderte von der Kathode zur Anode. Mit einer Digitalkamera unter UV-Licht wurde die Gelelektrophorese dokumentiert.

**50 x TAE** (Tris-Azetat-EDTA):    242 g Tris Base  
    57,1 ml Eisessig  
    100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)  
    mit H<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen

### 2.10.2 Formaldehyd Gel

Zur Auftrennung von RNA wurde ein Formaldehyd Gel verwendet. Zum einen diente es zur Kontrolle der RNA Qualität, zum anderen ist es eine Vorlage zum Transfer der RNA auf eine Membran (Blotting).

1 g Agarose wurde in 10 ml MOPS buffer (0,4 M) und 85 ml H<sub>2</sub>O aufgekocht und gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 60 °C, wurden 5,6 ml 25 % Formaldehydlösung hinzugegeben. Die Lösung wurde anschließend in eine vorbereitete Kammer gegossen.

Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS buffer verwendet.

2 µl RNA Probe wurden mit 10 µl „formaldehyd loading buffer“ vermischt und 2 min bei 98 °C kurz aufgekocht, bevor sie auf das Gel geladen wurden. Zur Bestimmung der Größe, wurde ein RNA Ladder Marker auf das Gel aufgetragen.

#### **Formaldehyd loading buffer:**

80 µl 10 x MOPS buffer (0,4 M)  
360 µl Formamide (48 %)  
130 µl Formaldehyd (37 %)  
50 µl Ethidiumbromid (10 mg/µl)  
40 µl gesättigtes Bromphenolblau in H<sub>2</sub>O  
50 µl H<sub>2</sub>O

### **10 x MOPS Buffer**

83,7 g MOPS in 800 ml H<sub>2</sub>O

33,3 ml NaAc (3 M)

20 ml EDTA (0,5 M)

einstellen auf pH 7,0

auf 1 l mit H<sub>2</sub>O auffüllen

Dokumentiert wurde das Formaldehyd Gel mit einer Digital Kamera unter UV-Licht.

### 2.10.3 Gel Extraktion

Für die DNA-Extraktion aus einem Agarosegel wurde der „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Dazu wurde das zu eluierende Fragment zunächst aus dem Gel geschnitten und in einem speziellen Puffer gelöst. Mit Hilfe einer Membran wurde die DNA mit einigen Wasch- und Zentrifugationsschritten extrahiert und konnte weiter verarbeitet werden.

## **2.11 Klonierung und Plasmide**

### 2.11.1 Klonierung

Mit einer Klonierung können PCR Produkte in einen Plasmid Vektor übertragen und anschließend mit E.coli Bakterien spezifisch vervielfältigt werden.

Alle Klonierungen in dieser Arbeit wurden mit dem Topo TA cloning Kit<sup>®</sup> von Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup> (Paisley, UK) durchgeführt.

Die Aufnahme des PCR Produktes in den Vektor wurde in diesem Protokoll durch eine Topoisomerase I aus einem Vaccinia Virus vollzogen. Diese konnte an 5'-CCCTT-3' Sequenzen binden und markierte den Anfang und das Ende des Fragmentes. Das Plasmid enthielt neben einem Ampicillinresistenzgen einen lac Promoter für die Genexpression und ein Gen für die Beta-Galaktosidase (lacZ), welches in der multiple cloning site (MCS) liegt.

Zur Hitzeschock Transformation wurden PCR Produkt, Salzlösung und TOPO<sup>®</sup> Vektor in einem Gesamtansatzvolumen von 6 µl vermischt. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 2 µl zu chemisch kompetenten E. coli Bakterien hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 bis 30 min auf Eis, wurden sie für

## Material und Methoden

30 sec hitzeschocktransformiert bei 42 °C. 250 µl SOC Medium wurden hinzugefügt und die Probe 1 h bei 37 °C geschüttelt.

LB Agar Platten mit Ampicillin wurden mit x-Gal, d.h. 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-Galaktosid, behandelt und angewärmt. Das Plasmid enthielt das Gen für das Enzym Beta-Galaktosidase (lacZ). Dieses Enzym spaltete Beta-D-Galaktoside in Galaktose und dem entsprechenden Alkohol. X-Gal war das entsprechende Substrat zu diesem Enzym. Da das Gen LacZ in der multiple cloning site (MCS) liegt, wurde es bei Aufnahme des PCR Produktes in das Plasmid zerstört - bleibt es jedoch erhalten, d.h. fand keine Aufnahme statt, so wurde eine lacZ Genexpression möglich, und es entstand als Spaltprodukt von X-Gal durch die Beta Galaktosidase ein Indigofarbstoff, der die Kolonien blau färbte. Auf diese Weise konnten die Kolonien ausgewählt werden, welche das PCR Produkt aufgenommen hatten.

10 bis 50 µl des Transformationsansatzes wurden auf der Platte ausgestrichen und bei 37 °C für 24 h inkubiert.

Die gewachsenen weißen Kolonien wurden gepickt und in Ampicillin behandeltem, flüssigem LB Kulturmedium vermehrt.

### **LB Medium**

10 g Bacto tryptone  
5 g Bacto Hefeextrakt  
10 g NaCl  
auffüllen auf 1 l mit H<sub>2</sub>O  
einstellen auf pH 7,0  
autoklavieren

### **SOC Medium**

20 g bacto tryptone  
5 g Bacto Hefeextrakt  
0,5 g NaCl  
10 ml KCl (250 mM)  
einstellen auf pH 7,0

Mittels MINI-, MIDI- oder MAXI-Prep (Qiagen, Hilden) konnten nun die Plasmide aus den Bakterien extrahiert werden.

### 2.11.2 Glycerol stock

Um die Bakterien mit dem entsprechendem Plasmid im Flüssigmedium über lange Zeit stabil bei -80°C zu lagern, wurde dem Medium im Verhältnis 1:1 Glycerol zugegeben und der Ansatz in einem Kryoröhrchen bei entsprechender Temperatur aufbewahrt.

## Material und Methoden

### 2.11.3 Plasmidpräparation

Um die Plasmid DNA zu extrahieren wurden kommerziell erhältliche Reaktionskits verwendet.

Abhängig von der Menge der eingesetzten Bakterien und der benötigten DNA, wurde entsprechend ein MINI-, MIDI-, oder MAXI-Prep durchgeführt. Aus einem MINI Kit erhielt man bis zu 20 µg Plasmid-DNA, aus einem MIDI Kit 200 µg Plasmid-DNA und aus einem MAXI Kit bis zu 10 mg Plasmid-DNA.

Dabei wurden die Bakterienkulturen zunächst mit NaOH und SDS denaturiert. Auf diese Weise wurden die zellulären Proteine und die bakterielle DNA zerstört. RNase A wurde hinzugegeben, um die bakterielle RNA zu Oligonukleotiden zu degradieren. Neutralisiert wurde die Lösung durch die Zugabe von Kaliumazetat.

Bei MINI und MAXI Prep wurde Glasmilch verwendet, um die Plasmid DNA zu binden. Anschließend erfolgte eine Eluierung.

Bei dem QIAGEN MIDI Prep Filter wurde zur DNA Bindung ein Anionenaustauscharz verwendet. Es fand eine Interaktion zwischen dem negativ geladenen Phosphat der DNA und den positiv geladenen DEAE (Diethylaminoethanol)-Gruppen statt. Salzkonzentration und pH Wert bestimmten dabei die Bindungsstärke. So wurde die Plasmid DNA bei niedriger Salzkonzentration fest an das Harz gebunden, während eine hohe Salzkonzentration eine Eluierung zuließ.

Das Produkt wurde anschließend jeweils mit Isopropanol gefällt.

Die Konzentration der DNA wurde fotometrisch bestimmt.

### 2.11.4 Restriktionsverdau

Durch einen Restriktionsverdau konnte der klonierte Vektor geschnitten werden. Man bediente sich hierbei Restriktionsenzymen, Endonukleasen, die spezifisch eine Basensequenz im DNA-Doppelstrang erkennen und beide Stränge der Doppelhelix schneiden konnten. Die Erkennungssequenzen der meisten Restriktionsenzyme besaßen eine zweizählige Rotationssymmetrie. Diese Sequenzen bezeichnete man als Palindrome. Die Enzyme konnten versetzt zum Zentrum schneiden, wie beispielsweise das hier verwendete Eco RI Enzym, so dass man überhängende, so genannte kohäsive Enden („sticky ends“) erhielt.

## Material und Methoden

Es wurden des Weiteren Enzyme verwendet, die mit der Symmetrieachse schnitten. In diesem Fall erhielt man jeweils Enden ohne Überhang („blunt ends“).

2 µg Plasmid DNA wurden verdaut. Das Enzym hatte eine Aktivität von 5 U, das bedeutete, dass das Enzym 5 µg DNA pro Stunde bei 37 °C verdaute. Zugemischt wurde dem Ansatz, je nach Enzym, ein zehntel BSA und Puffer. Aufgefüllt wurde das Volumen mit H<sub>2</sub>O.

Die Kontrolle des Produktes erfolgte durch ein Agarose Gel.

### 2.12 Northern Blotting

#### 2.12.1 Gel-Membran Transfer

Um Größe und Expressionsmuster von RNA zu analysieren, verwendet man u.a. Northern Blot-Analysen.

Beim Northern Blot wird RNA von einem Formaldehyd Gel auf eine Nylonmembran (Zeta-Probe-Membran®) übertragen und immobilisiert. Anschließend können radioaktiv markierte RNA- oder DNA-Sonden auf dieser Membran binden. Auf diese Weise konnten bestimmte RNA Sequenzen identifiziert und analysiert werden. Zunächst wurde RNA auf ein Formaldehydgel geladen. Anschließend sollten die RNA-Proben mittels Kapillarkraft in eine Nylonmembran transferiert werden. Als Puffer wurde 20 x SSC verwendet. Das vorher von Formaldehyd befreite Gel und die Membran wurden in ein „transfer sandwich“ aus „whatman“ Papier und saugfähigen Tüchern eingebettet. Auf diese Weise wurde, aufgrund der kapillaren Sogwirkung, die RNA nach oben in die darüberliegende Membran überführt.

Die Membran wurde anschließend zur RNA-Fixation für 1h bei 80 °C im Ofen gebacken. Eine andere Möglichkeit der Fixation bestand darin, die Membran für 3-5 min UV-Licht der Wellenlänge 254 nm auszusetzen.

Nun konnte die Membran in Klarsichtfolie eingeschweißt und bei Raumtemperatur gelagert werden.

#### 2.12.2 Markierung der DNA-Sonden

DNA- oder RNA-Sonden konnten auf dieser Membran binden. Auf diese Weise konnten bestimmte RNA Abschnitte eines Gens identifiziert werden.

## Material und Methoden

Die verwendeten DNA-Sonden hatten eine Länge von etwa 600 bp. 25 ng DNA wurden als Ausgangsprodukt für die Sonde verwendet. Die DNA-Probe wurde durch Subklonierung eines PCR Fragmentes und anschließendem Verdau generiert.

Die Sonden wurden mit dem „random-primed-labeling“ Prinzip nach Feinberg und Vogelstein markiert. Dabei wurde die DNA zunächst 10 min bei 100 °C denaturiert. Anschließend wurde der komplementäre Strang durch eine Klenow Polymerase synthetisiert, wobei „random Primer“, d.h. Oligonukleotide mit zufälliger Basensequenz, verwendet wurden. Hinzugegeben wurden dATP, dGTP, dTTP und P<sup>32</sup>-markiertes  $\alpha$ -dCTP. So setzte die Polymerase an jeder Stelle, an der sie ein Cytosin einbaute, gleichzeitig das radioaktive Phosphat ein und markierte so die Probe.

Nach 1 h bei 37°C wurde die Reaktion mit 2  $\mu$ l EDTA (0,2 M) pH 8,0 beendet.

Die markierte Sonde wurde mit Hilfe einer G50 Säule gereinigt.

Anschließend wurde die Radioaktivität der eluierten Proben gemessen.

### 2.12.3 Hybridisierung

In einem ersten Schritt wurde die Membran in einem Ofen bei 70 °C in 6 ml Hybridisierungspuffer für eine Zeit zwischen 15 min und 4 h prähybridisiert.

Die markierten Proben wurden vorbereitet, indem sie unmittelbar vor der Hybridisierung über 5 Minuten bei 98 °C denaturiert und anschließend auf Eis inkubiert wurden.

Dann wurde der Hybridisierungspuffer aus dem Prähybridisierungsschritt entfernt und die Probe mit 6 ml vorgewärmtem Hybridisierungspuffer hinzugegeben.

Die Hybridisierungstemperatur für 24 Stunden war abhängig von der Größe der Probe und betrug zwischen 72 °C und 74 °C.

### 2.12.4 Waschschrift

Ungebundene Radioaktivität wurde von der Membran gewaschen.

Folgende Waschschriffe erfolgten:

2 x 20 min	2 x SSC + 0,1 % SDS	bei Raumtemperatur
2 x 15 min	1 x SSC + 0,1 % SDS	bei 65 °C

Anschließend wurde die Membran in eine Klarsichtfolie überführt und ein Film in einer Kassette mit Intensivierungsscreen bei -80 °C belichtet. Die durchschnittliche Belichtungsdauer betrug 12 bis 24 h.



## Material und Methoden

**20 x SSC** 175,3 g NaCl  
88,2 g Na-Zitrat  
auffüllen auf 1 l mit H<sub>2</sub>O  
einstellen auf pH 7,0  
autoklavieren

### 2.12.5 Membran stripping

Um die hybridisierte Probe von der Membran zu entfernen und anschließend eine neue Probe auf der Membran zu hybridisieren, wurde die Membran bei 70 °C für einige Stunden mit 2 x SSC gewaschen. Der Waschschrift wurde solange wiederholt, bis keine Radioaktivität mehr detektiert werden konnte.

## 2.13 Western Blot

### 2.13.1 Whole cell extract

Für die Zellextraktion wurden Zellen in einer Zellkulturschale zunächst mit eiskaltem PBS abgewaschen. Anschließend wurde 800 µl RIPA-Puffer, 1 mM DTT und 1 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid) auf die Zellen gegeben. Auf diese Weise wurde die Zellemembran zerstört. Nach kurzer Einwirkzeit wurden die Zellen aus der Zellkulturschale entfernt, aufgelöst und in ein Eppendorf Cap<sup>®</sup> überführt. Nach 5 min Inkubation auf Eis, wurde die Probe 15 min bei 4 °C mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Proteinüberstand wurde entnommen, in ein neues Eppendorf Cap<sup>®</sup> überführt und bei – 80 °C gelagert.

### **RIPA-Puffer** 150 mM NaCl

20 mM Tris (pH 7,5)  
1 mM EDTA  
1 % NP-40  
1 % DOC  
0,1 % SDS  
5 mM NaF  
1 Tablette Proteinaseinhibitor (Boehringer<sup>®</sup>)  
auffüllen mit H<sub>2</sub>O auf 100 ml

## Material und Methoden

### 2.13.2 BRADFORD Assay

Ein BRADFORD Assay diente der Proteinkonzentrationsbestimmung. Auf eine 96-well-Platte wurden zunächst Proteinstandards aufgetragen. Diese wurden fotometrisch bei 595 nm gemessen. Zur Proteinmengenbestimmung wurde anschließend 1 µl Standard zu 1 µl Probenpuffer, 38 H<sub>2</sub>O und 160 µl BRADFORD Reagenz gegeben. Die Proteinmenge wurde fotometrisch im Verhältnis zu den Standardkonzentrationen bestimmt.

### 2.13.3 SDS-PAGE

Mit einem Western Blot war es möglich, die Proteinmenge und Proteinexpression zu bestimmen.

Die Auftrennung der denaturierten Proteine erfolgte über eine SDS-polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page). Die Proteine durchliefen dabei zunächst ein Sammelgel und anschließend das eigentliche Trenngel. Die beiden Gele unterschieden sich sowohl im pH-Wert als auch in Ihrer Polyacrylamidkonzentration.

#### **Trenngel (12 %)**

4 x separating buffer	2,5 ml
Polyacrylamid, PAA (30 %)	4 ml
Ammoniumpersulfat, APS (14 %)	15 µl
TEMED	6 µl
H <sub>2</sub> O	3,5 ml

#### **Sammelgel**

4x stacking buffer	1,25 ml
Polyacrylamid, PAA (30 %)	750 µl
Ammoniumpersulfat, APS (40 %)	7,5 µl
TEMED	3 µl
H <sub>2</sub> O	2,98 ml

Die Proben wurden vorbereitet, indem 10 µl Probe mit 10 µl loading buffer (20 ml SDS 4 %, 100 mM Tris-Cl (pH 6,8), 5 ml 20 % Glycerol, 10 ml 8 M Urea, 24 g Bromphenolblau) 3 min bei 99 °C aufgekocht wurden und anschließend 0,5 µl DTT zugegeben wurde.

## Material und Methoden

Neben den Proben wurden 10 µl weight marker mit 10 µl loading buffer vermischt, aufgekocht und als Größenstandard geladen.

In der Gelkammer diente eine Lösung aus 100 ml 10x Tris-Glycine-Buffer, 10 ml 10 % SDS und 890 ml H<sub>2</sub>O als Tank Buffer.

### 2.13.4 Proteintransfer

Nachdem die Proben sich in dem Gel verteilt hatten, mußten die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran überführt werden.

Dazu wurde eine Blotting-Vorrichtung aufgebaut, bestehend aus 2 Filterpapieren getränkt in A1 Buffer, 1 Filterpapier getränkt in A2 Buffer und der Membran, die zuvor 15 sec mit Methanol, 2 min H<sub>2</sub>O und 5 min A1 Buffer behandelt worden war.

Anschließend folgten das Gel, wobei das Sammelgel vorher abgetrennt worden war, und drei Filterpapiere, behandelt mit CAPS Buffer.

Zum Proteintransfer wurde, abhängig von der Gelgröße, eine Stromstärke von 38 mA pro Blot gewählt.

<b>Anodenpuffer 1(A1)</b>	<b>Anodenpuffer 2(A2)</b>	<b>CAPS Puffer</b>
0,1 M Tris-Base	25 mM Tris-Base	70 mM CAPS
20 % Methanol	20 % Methanol	20 % Methanol
H <sub>2</sub> O ad 1 l	H <sub>2</sub> O ad 1 l	H <sub>2</sub> O ad 1 l

Nach einer Blotzeit von 2 h, wurden die Proteine, um unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden, auf der Membran geblockt. Zu diesem Zwecke wurde 4 g Magermilchpulver in 40 ml 0,04 % PBS-T (4 ml Tween und 996 ml 1x PBS) gelöst. Darin wurde die Membran übernacht bei +4°C aufbewahrt.

### 2.13.5 Immundetektion und Chemolumineszenz

Zur Immundetektion wurde die Membran mit PBS-T von der Magermilchpulverlösung befreit und anschließend 1 h in dem verdünnten ersten Antikörper schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2 x 15 min in PBS-T gewaschen. Dann folgte das zweite Antiserum in einer Verdünnung von 1:10000 für 40 min, welches an den ersten Antikörper binden konnte.

Nach drei Waschsritten von 10 min konnte das gewünscht Protein detektiert werden. Dazu wurde auf die Membran ein ECL-Mix gegeben. Hierbei wurde über eine Meerettich-Peroxidase (HRP), die an das zweite Antiserum gekoppelt war, die

## Material und Methoden

Oxidation des Farbstoffes Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid katalysiert. Luminol wurde auf diese Weise in einen angeregten Zustand versetzt und ging durch Lichtemission in seinen Grundzustand zurück. Die Lichtemission konnte mit einem Röntgenfilm detektiert werden.

### **2.14 Densitometrische Auswertung**

Die densitometrische Auswertung aus den Experimenten mit RT-PCR, Northern- und Western Blot Analysen erfolgte durch die Auswertungssoftware Scion Image Beta 4.02 Frederick, USA anhand der Bandenstärke.

### **2.15 Immunzytochemie**

Um die Lokalisationen und Expressionen verschiedener Proteine in Zellen oder Gewebeschnitten zu detektieren, wurden die Präparate mit einem Antiserum immunzytochemisch gefärbt.

Zunächst wurden Zellen in niedriger Konzentration auf einem Objektträger ausgesät. Nach etwa 24 h wurde das Medium entfernt und der Objektträger mit 1 x PBS bei Raumtemperatur gespült.

Um die Zellen auf dem Objektträger zu fixieren, wurden sie für 15 min bei Raumtemperatur in 2,5 – 4 % Paraformaldehyd (PFA) inkubiert.

Es folgte ein Inkubationsschritt zur Zellmembranpermeabilisierung mit Triton (0,1 %), welches in PBS gelöst war, für 5 bis 10 min.

Anschließend folgten drei Waschschrte über je 10 min mit PBS, wobei man hier jeweils etwas BSA zusetzte.

Um unspezifische Antikörperbildung zu verhindern, wurden die Zellen mit 2 % BSA und 4 % NDS über 30 min geblockt.

Das erste Antiserum, mit einem Gesamtvolumen von 200 µl, wurde auf den Objektträger gegeben und entweder bei 4 °C übernacht oder für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger 3 mal 5 min in PBS gewaschen.

## Material und Methoden

Nach einer 30 minütigen Behandlung mit 3 % NDS, wurde das zweite Antiserum zur Detektion in einer Verdünnung von 1:1000 oder 1:1500 für 30 bis 60 min hinzugegeben.

Zur Kernfärbung gab man für die letzten 5 min 200 µl 1:6000 verdünntes DAPI (4-6-Diamino-2-phenylindol) hinzu.

Unter einem Immunfluoreszenzmikroskop erfolgte die Analyse der immunzytochemisch gefärbten Präparate.

### **2.16 Insulin-ELISA**

Die Insulinsekretion von Beta-Zellen wurde mit einem Insulin-ELISA (Mercoxia, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Bei diesem Sandwich-ELISA wurde das zu detektierende Antigen, in diesem Fall Insulin, durch ein immobilisiertes Antiserum am Boden einer 96 well Platte gebunden. Durch ein zweites Antiserum, das ein unabhängiges Epitop des Antigenes band, wurde eine enzymatische Nachweisreaktion vermittelt. Eine Peroxidase, welche mit dem zweiten Antiserum verknüpft war, katalysierte eine chemische Reaktion, die zu einer Lichtemission führte, welche fotometrisch bestimmt werden konnte.

Zunächst wurde der ELISA mittels Standardproben geeicht. Auf diese Standardwerte wurde der Meßwert der Probe bezogen.

Zu der Probe in einer 96 well Platte mit dem ersten Antiserum wurde eine Konjugatlösung mit dem zweiten Antiserum gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert.

Nach 6 Waschschritten mit je 350 µl Waschlösung, wurden 200 µl der Peroxidase Lösung hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure (1 M) gestoppt.

Der Absorptionswert wurde bei einer Lichtwellenlänge von 450 nm gemessen und eine Absorptionskurve erstellt. Anhand dieser Werte wurde die Insulinkonzentration in der Probe bestimmt.

### 2.17 DNA-Sequenzierung

Zunächst wurde eine PCR mit einer AmpliTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase durchgeführt. Bei der PCR wurden Nukleotide verwendet, die mit einem fluoreszierenden Agens markiert waren. Jede der vier Basen zeigt ein anderes Emissionsspektrum.

Nachdem das PCR Produkt gefällt und gereinigt worden war, wurde es automatisiert in eine Gelkapillare gezogen. Je nach Größe und Position wanderten die Basen in der entsprechenden Reihenfolge und werden mit dem ABI 310<sup>®</sup> - Sequenzierer analysiert.

Der PCR-Ansatz enthielt 200 bis 500 ng Doppelstrang DNA, einen Primer mit der Konzentration von 3,2 pmol/ $\mu$ l und 4  $\mu$ l Big Dye<sup>®</sup> Mix. Mit H<sub>2</sub>O wurde das Gesamtvolumen auf 20  $\mu$ l aufgefüllt.

Der Big Dye<sup>®</sup> Mix enthielt eine AmpliTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase, Tris-HCl buffer (pH 9,0), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), Deoxynucleosid Triphosphate (dATP, dCTP, dITP, dUTP), A-Dye Terminator gelabeled mit dichloro [R6G], C-Dye Terminator markiert mit dichloro [ROX], G-Dye Terminator gelabeled mit dichloro [R110] und T-Dye Terminator markiert mit dichloro [TAMRA].

PCR Bedingungen:

25 Zyklen:

96 °C      10 sec

50 °C      5 sec

60 °C      4 min

4 °C     $\infty$

Die PCR-Probe wurde mit einer G50 Säule aufgereinigt.

Anschließend wurden zur Produktfällung 80  $\mu$ l Isopropanol (75 %) zugegeben und bei Raumtemperatur für 15 min präzipitiert. Danach wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 250  $\mu$ l Isopropanol (75 %) gelöst.

Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt für 5 min wurde der Überstand entfernt, das Pellet getrocknet und alle Spuren von Isopropanol entfernt.

Das Pellet wurde in 20  $\mu$ l TSR (Template Supression Reagenz) gelöst und für 2 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend erfolgte die Sequenzierung.

### 2.18 PP-1 Aktivitätsassay

Mit diesem Assay von Ragolia und Begum [125] war es möglich, die Aktivität des Enzyms Protein Phosphatase 1 (PP-1) zu analysieren. Dieser Assay war im Zusammenhang mit der Wirkung von Insulin auf Leberzellen bzw. Fettzellen [126] etabliert worden. Aus diesem Grunde wurden Insulin stimulierte Hep-G2 Zellen als Kontrolle verwendet.

Das Prinzip bestand darin, dass zunächst die Phosphatase aus Zellen isoliert wurde. Nach der Extraktion wurde der Probe eine  $P^{32}$ -markierte Phosphorylase-B-Phosphorylase-Kinase Mischung zugegeben. In einer enzymatischen Reaktion spaltete die isolierte Phosphatase das radioaktiv markierte Phosphat aus dem Phosphorylase-Phosphorylase-Kinase Mix ab. Das entstehende freie  $P^{32}$  wurde gemessen. Je mehr freies  $P^{32}$  in der Reaktion entstand, desto mehr Aktivität besaß die Phosphatase.

In dieser Arbeit wurden INS-1 Beta-Zellen mit 100 nM Leptin über 48 h stimuliert bzw. mit einem Kontrollvehikel behandelt.

Als Kontrolle des Assays wurden Hep-G2 Zellen für 30 min mit Insulin stimuliert oder ebenfalls mit einem Vehikel behandelt.

Alle Zellen sind zuvor für 24 Stunden in einem serumfreien Medium gehalten worden.

#### 2.17.1 Zellextraktion

Nach der Stimulation wurden die Zellen dreimal mit PBS abgewaschen.

500  $\mu$ l „phosphatase extraction buffer“ wurde hinzugegeben, die Zellen abgeschabt und im Puffer gelöst.

Für 10 Sekunden wurden die gelösten Zellen bei 20 % mit 0,1 on/off Zyklen im Sonicator behandelt. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 2000 g zentrifugiert, um die größeren Zellbestandteile zu entfernen. Der Überstand wurde entnommen und in ein neues Tube überführt.

Die Probe wurde auf ein Gesamtvolumen von 5 ml aufgefüllt und in einer Ultrazentrifuge für 1h 20 min mit 100.000 g bei 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde entfernt.

Das Pellet wurde in 500  $\mu$ l „phosphatase extraction buffer“ als zytosolische Fraktion aufgenommen. Der Proteingehalt wurde mit einem Bradford Assay bestimmt.

## Material und Methoden

### 2.17.2 radioaktive Markierung von Glycogen Phosphorylase A

103  $\mu\text{l}$   $\text{P}^{32}$   $\alpha$ -ATP ( $> 3000 \text{ Ci/nM}$ ) wurden auf ein Gesamtvolumen von 500  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und mit 300  $\mu\text{l}$  „phosphorylation reaction buffer“ versetzt. Des Weiteren wurden 100  $\mu\text{l}$  Phosphorylase-B (100mg/ml) mit 1  $\mu\text{l}$  Phosphorylase-Kinase vermischt und mit der extrahierten Probe für 1 h bei 30 °C inkubiert.

Beendet wurde die Reaktion durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Ammoniumsulfat (90 %) und einer Inkubation auf Eis für 30 min.

Anschließend wurde die Probe mit 12.000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 1 ml Ammoniumsulfat (45%) gewaschen und mit 12.000 g erneut für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde viermal wiederholt.

Danach wurde das Pellet in 1 ml „solubilization buffer“ aufgelöst und in einen Konzentrator gegeben. Der Konzentrator wurde mit 5000 g zentrifugiert, solange bis ein Restvolumen von 400  $\mu\text{l}$  vorhanden war. Das Probengesamtvolumen wurde danach erneut auf 2 ml aufgefüllt, und wie zuvor wurde die Probe durch Zentrifugation auf ein Volumen von 400  $\mu\text{l}$  konzentriert.

Die Probe wurde in ein 4 ml Tube überführt und auf ein Volumen von 3,1 ml aufgefüllt. So entsprach die Konzentration der Probe 3 mg pro ml Phosphorylase-a. Die markierte Probe wurde bei 4 °C gelagert.

### 2.17.3 Messung der enzymatischen Aktivität

Es wurden 5  $\mu\text{g}$  Protein pro Probe eingesetzt. Mit eiskaltem Assay-buffer wurde das Volumen auf 40  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Dabei wurde jeder Probe in einem zweiten Ansatz auch 4  $\mu\text{l}$  Calyculin A (Cal A), ein spezifischer Hemmstoff der Protein Phosphatase 1, zugegeben. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 20  $\mu\text{l}$   $\text{P}^{32}$  markierter Phosphorylase-a gestartet. Diese Mischung wurde für 10 min bei 30 °C inkubiert und anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 180  $\mu\text{l}$  eiskalter Trichloressigsäure (20 %) und 10  $\mu\text{l}$  BSA (3 %) gestoppt.

Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurden die Proben mit 12.000 g für 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde in 200  $\mu\text{l}$  Probe die Radioaktivität gemessen.

Ausgehend von der gemessenen  $\text{P}^{32}$  Aktivität konnte die spezifische Substrataktivität SPA und die Protein Phosphatase Aktivität errechnet werden.



## Material und Methoden

$$\text{SPA} = \frac{(\text{totale cpm/reaction tube} - \text{cpm blank})}{0,62 \text{ nMs phosphatase}}$$

$$\text{Protein Phosphatase Aktivität} = \frac{\text{cpm (Probe)} - \text{cpm (leer)} \times 1000}{\text{SPA} \times 10 \text{ min} \times \mu\text{g Protein/Rxn}}$$

[nMsP<sub>i</sub> released/min/mg protein]

### Phosphorylation Extraction/Assay buffer:

Imidazol HCl pH 7,2) (20 mM)  
EDTA (2 mM)  
β-Mercaptoethanol (0,2 %)  
Glycogen (2 mg/ml)  
Benzamidine (1 mM)  
Phenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) (1mM)  
Aprotinin  
Leukopeptin  
Antipain je 10 μg/μl  
Lagerung in 5-10 ml Aliquots bei -20°C

**Phosphorylation reaction buffer:** Tris-HCl pH 8,2 (250 mM)  
MgCl<sub>2</sub> (16,7 mM)  
ATP (1,67 mM)  
CaCl<sub>2</sub> (0,83 mM)  
β-Glycerolphosphat (133 mM)  
Lagerung in 300 μl Aliquots bei -20 °C

**Solubilization buffer:** Tris-HCl pH 7,0 (50 mM)  
EDTA (0,1 mM)  
Koffein (15 mM)  
β-Mercaptoethanol (0,1 %)  
Lagerung bei -20 °C

## 2.19 Kalzium-Influx Messung mit FURA 2 Methode

Die  $\text{Ca}^{2+}$ - Messungen wurden mit der FURA-2-Imaging Methode durchgeführt [127]. INS-1 Zellen wurden auf Objektträger ausgesät und in INS-1 Medium kultiviert.

Die INS-1 Zellen wurden in einer FURA-2/AM Lösung (5  $\mu\text{M}$ , Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit INS-1 Zellen in eine Messkammer überführt. Der verwendete Puffer in der Messkammer bestand aus 130 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 6 mM Glukose, 20 mM HEPES, 2 % BSA und 0,1 Pluronic F-127 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

Die Messungen erfolgten unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert IM 135, Carl Zeiss, Jena).

FURA-2 bildete mit  $\text{Ca}^{2+}$  einen Komplex, der bei einer Wellenlänge von 340 und 380 nm zur Fluoreszenz angeregt wird.

Der Kalzium-Influx wurde in INS-1 Zellen nach einer Stimulation mit Leptin (100 nM) und Cal A (40  $\mu\text{M}$ ) in Medium mit 0,5 mM Glukose bzw. 6 mM Glukose gemessen.

Die Signalmessung erfolgte mit einem Spektrofluorometer (Deltascan 4000, Photon Technology Instruments, Wedel).

## 2.20 Statistik

Die Ergebnisse wurden mit dem Student's unpaired t Test und ANOVA Test analysiert. Unterschiede mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit (p-Wert) < 0,05 wurden als signifikant für die Nullhypothese bewertet.

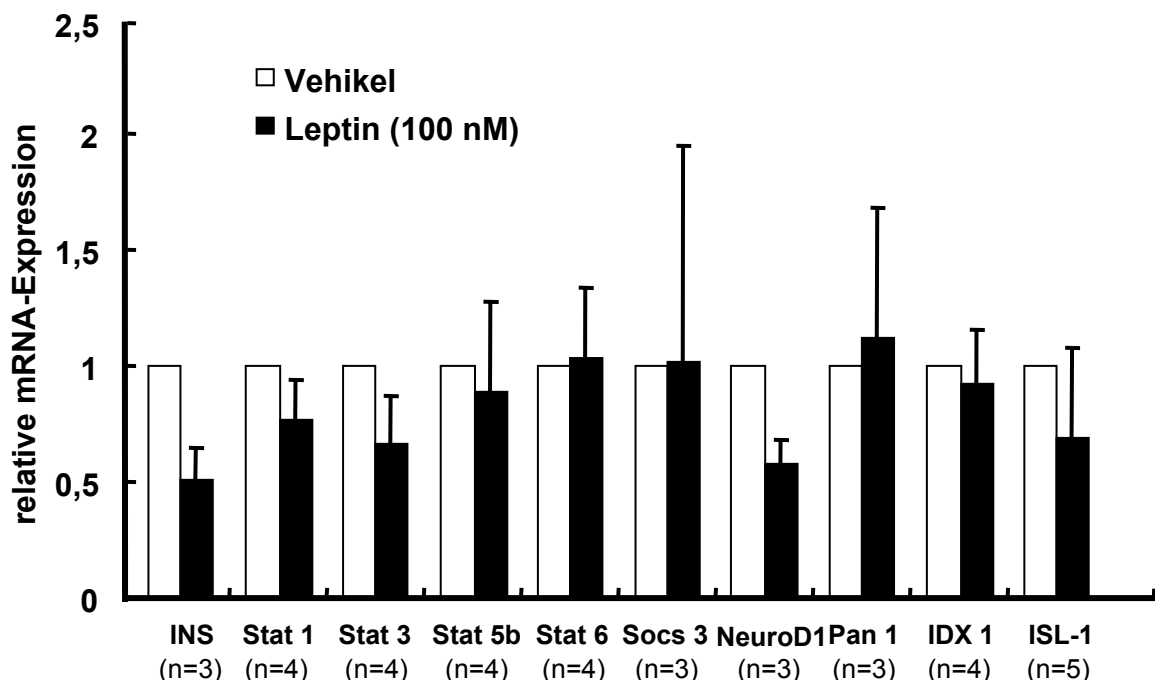
Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistiksoftware GraphPad Prism 4 (Version 4.01).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Regulation der mRNA-Expression durch Leptin in INS-1 Beta-Zellen

Mit semiquantitativer RT-PCR wurde die mRNA-Expressionsregulation ausgewählter Gene in INS-1 Beta-Zellen nach einer Stimulation mit 100 nM Leptin über 24 Stunden bzw. nach Behandlung mit einem Kontrollvehikel untersucht (Abb. 7, Tab.2).



**Abbildung 7:** Relative mRNA-Expression nach Stimulation mit 100 nM Leptin über 24 h und Behandlung mit einem Kontrollvehikel in INS-1 Zellen.

## Ergebnisse

Gen	Vehikel	Leptin	p-Wert
INS	1	0,51 ± 0,14	0.0872
STAT 1	1	0,77 ± 0,17	0.5344
STAT 3	1	0,67 ± 0,21	0.1942
STAT 5b	1	0,89 ± 0,39	0.3219
STAT 6	1	1,02 ± 0,30	0.1614
SOCS 3	1	1,03 ± 0,93	0.7137
Neuro D1	1	0,57 ± 0,11	0.1741
Pan 1	1	1,12 ± 0,56	0.6442
IDX 1	1	0,93 ± 0,23	0.5856
ISL-1	1	0,69 ± 0,39	0.2906

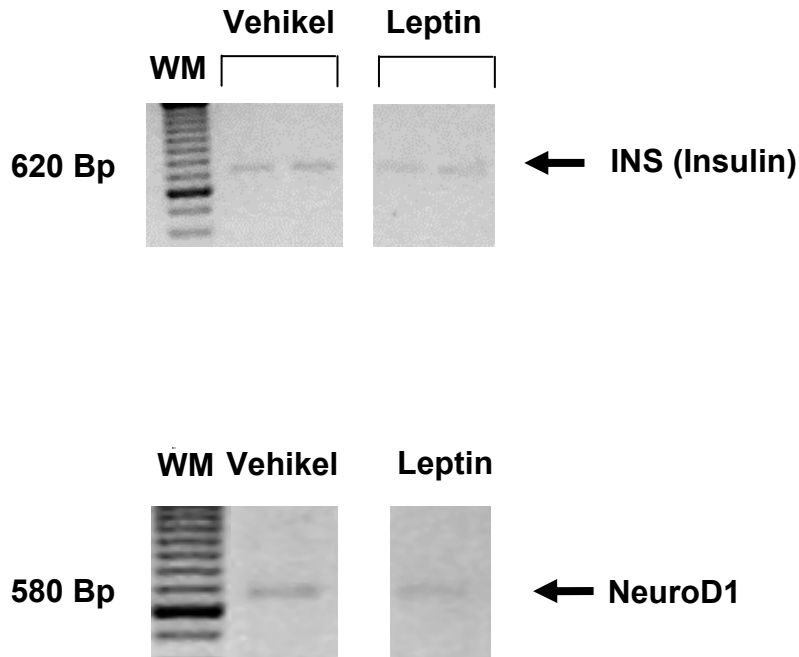
**Tabelle 2:** Relative mRNA-Expression in INS-1 Beta-Zellen nach Stimulation mit 100 nM Leptin im Vergleich zu Kontrollvehikel.

Es konnte eine nicht signifikante Hemmung der mRNA-Expression von Proinsulin um 49 % ± 0,14 in INS-1 Beta-Zellen nachgewiesen werden. Hiermit bestätigten sich bereits publizierte Ergebnisse, die ebenfalls eine hemmende Leptinwirkung auf die Proinsulingenexpression nachweisen konnten.

Des Weiteren wurden Gene des JAK/STAT Signalweges untersucht. In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte keine signifikante Änderung der mRNA-Expression nach einer Stimulation mit 100 nM Leptin über 24 Stunden von STAT1, STAT3, STAT5b und STAT6 in INS-1 Zellen beobachtet werden. Die mRNA-Expression von SOCS 3 wurde ebenfalls in INS-1 Zellen nicht durch 100 nM Leptin über 24 h reguliert.

Schließlich wurden zwei Transkriptionsfaktoren, die zu den bHLH Proteinen gehörten, Pan 1 und Neuro D1, untersucht. Die mRNA-Expression von Pan 1 veränderte sich nach einer Stimulation mit 100 nM Leptin in INS-1 Zellen nicht. Dagegen wurde die mRNA-Expression von Neuro D1 in INS-1 Zellen nach einer Stimulation mit 100 nM Leptin über 24 h um 43 % ± 0,11 nicht signifikant gehemmt (Abb. 8).

## Ergebnisse



**Abbildung 8:** RT-PCR für die Gene INS und Neuro D1 nach Behandlung mit einem Kontrollvehikel und Stimulation mit 100 nM Leptin in INS-1 Zellen über 24 h (WM = weight marker).

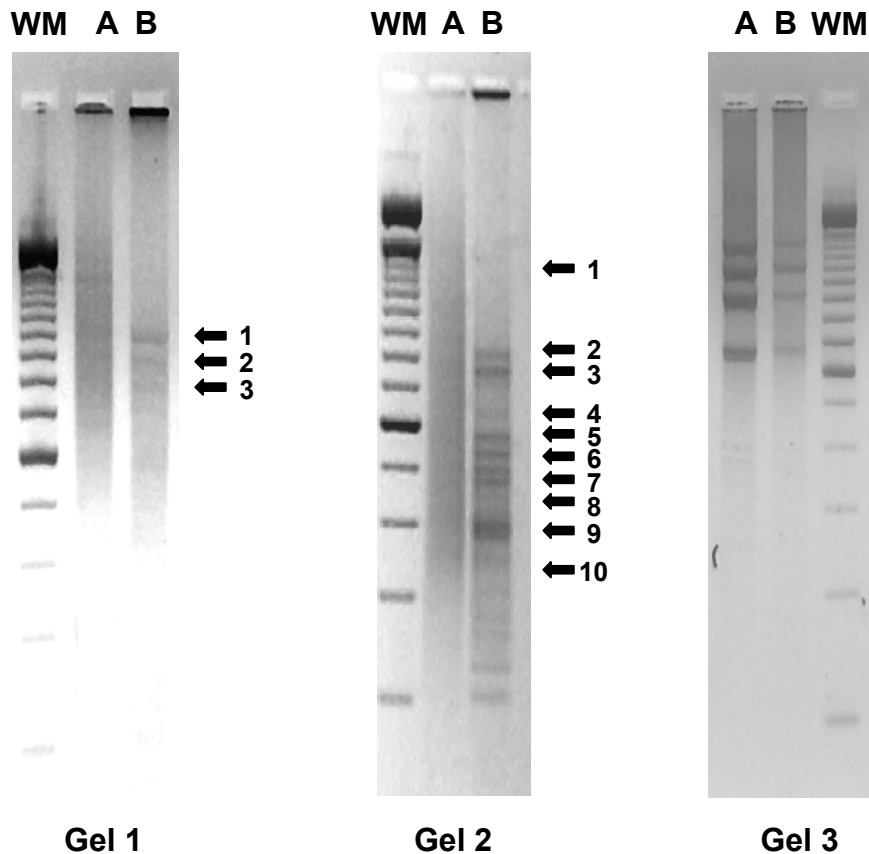
Zusammenfassend konnte mit semiquantitativer RT-PCR nachgewiesen werden, dass 100 nM Leptin die mRNA-Expression der Gene für STAT-1, STAT-3, STAT-5b, STAT-6, SOCS-3, IDX-1, Pan 1 und ISL-1 in INS Beta-Zellen nicht reguliert.

Die mRNA-Expression von Proinsulin und Neuro D1 wurde in INS-1 Zellen durch 100 nM Leptin gehemmt. Allerdings waren diese Unterschiede nicht signifikant.

### 3.2 Subtraktions-PCR

Ein Ziel dieser Arbeit war es, durch eine Subtraktions-PCR neue Leptin regulierte Gene in der Beta-Zelle des endokrinen Pankreas zu identifizieren.

Die PCR Amplifikationen dieser Subtraktions PCR wurden mit einer „Taq Polymerase“ und mit einer „hotstart Klen-Taq-Polymerase“ durchgeführt. Die Proben wurden auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen (Abb. 9). Die entstandenen Banden wurden extrahiert, subkloniert und sequenziert. Die Sequenzen wurden anschließend mit der NCBI-Datenbank verglichen.



**Abbildung 9:** Gel 1: A unsubtrahierte cDNA , B subtrahierte cDNA nach Amplifikation mit Taq-Polymerase; Gel 2: A unsubtrahierte cDNA, B subtrahierte cDNA nach Amplifikation mit hotstart Klen-Taq-Polymerase; Gel 3: A/B Kontrollen mit DNA der Skelettmuskulatur nach durchgeführter Subtraktion-PCR.

## Ergebnisse

### Gel 1:

Nr.	Größe	Übereinstimmung (%)	Sequenzvergleich mit NCBI-Datenbank
1	ca. 1000 bp	84 %	- SIL, MAP_17, CYP_a, SCL & CYP_b (Mus musculus) <i>AJ297131.1</i>
		81 %	- L1cam (mus musculus) <i>AF1333093</i>
2	ca. 900 bp	97 %	- PC-12 cells, NGF-treated, clone RPNAP27 5' similar to secretogranin 1 (rattus norvegicus) <i>AA686109</i>
		96 %	- Chromogranin b, (rattus norvegicus) <i>NM_012526.1</i>
		89 %	- Gpr56 Serpentine receptor (Cyt28) (mus musculus) <i>NM_018882.1</i>
		62 %	- Acetyl LDL receptor, SREC=scavenger receptor (homo sapiens) <i>NM_003684.1</i>
3	ca. 800 bp	96 %	- mRNA for alpha(1) inhibitor 3 variant 1 (rattus norvegicus) <i>X52984.1</i>
		85 %	- TCR beta locus (mus musculus) <i>AE000663.1</i>
		84 %	- Mus musculus ATP-binding cassette 1, sub-family A, member 1 (Abca1) gene, <i>AF287263</i>

## Ergebnisse

### Gel 2:

Nr.	Größe	Übereinstimmung (%)	Sequenzvergleich mit NCBI-Datenbank
1	ca. 800 bp	97 %	- Secretogranin II (rattus norvegicus) <i>NM_022669.1</i>
		94 %	- Muscle Protein684 <i>AJ250192.1</i>
2	ca. 700 bp	96 %	- Selectin Glg 1(rattus norvegicus), <i>NM_017211.1</i>
3	ca. 600 bp	97 %	- Insulin (rattus norvegicus) <i>V01242.1</i>
4	ca. 550 bp	95 %	- Ribosomal protein L7a (rattus norvegicus) <i>X15013.1</i>
5	ca. 550 bp	97 %	- Ribosomal protein S11 (Rps11) (rattus norvegicus) <i>NM_031110.1</i>
8	ca. 220 bp	98 %	- Ppp1ca Protein phosphatase1 $\alpha$ catalytic subunit (rattus norvegicus) <i>NM_031527.1</i>
10	ca. 1400 bp	98 %	- PP-1 $\alpha$ (rattus norvegicus), <i>D00859.1</i>
		94 %	- Ppp1ca (mus musculus) <i>NM_031868.1</i>
		91 %	- Ppp1cc (mus musculus) <i>NM_01363.1</i>
8	ca. 220 bp	99 %	- Cytochrome b (rattus norvegicus) <i>AF295545</i>
		97 %	- ribosomal protein S11 (Rps11) (rattus norvegicus) <i>NM_031110.1</i>



## Ergebnisse

Mit semiquantitativer RT-PCR wurde die differenzielle Expression folgender Gene untersucht:

Cytochrome b

L1cam

GPR 56 Serpentine receptor

Secretogranin II

PP-1 $\alpha$

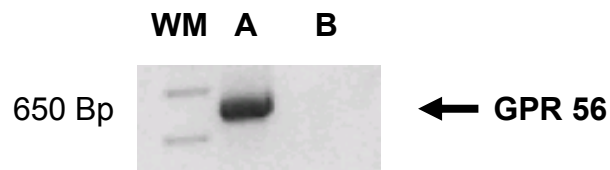
Glg1

Rps11

Bis auf die Gene für Secretogranin II und PP-1 $\alpha$  konnte keine differenzielle mRNA-Regulation durch 100 nM Leptin über 24 Stunden in INS-1 Zellen mit RT-PCR in diesen Genen beobachtet werden.

### 3.3 GPR 56 Serpentine Rezeptor

Der Serpentine Rezeptor GPR 56 gehört zur Gruppe der 7-transmembranären G Protein gekoppelten Orphan-Rezeptoren. Bisher wurde kein Ligand für diesen Rezeptor identifiziert (Abb 10).



**Abbildung 10:** A: Nachweis der mRNA-Expression von GPR-56 in INS-1 Beta-Zellen mit RT-PCR; B Negativkontrolle.

In der semiquantitativen RT-PCR wurde keine differenzielle Regulation des GPR 56 Rezeptors durch 100 nM Leptin in INS-1 Beta-Zellen beobachtet.

In der NCBI-Datenbank war die GPR 56 Rattensequenz nicht verzeichnet. Aus diesem Grunde wurde die vollständige Sequenz des Serpentine Rezeptors GPR 56 der Ratte sequenziert.

Die Mausequenz des GPR 56 Rezeptors (NM\_018882.1) diente als Vorlage für die Primersequenz, mit denen PCR Fragmente aus Ratten cDNA amplifiziert wurden. Die PCR Produkte wurden sequenziert und die vollständige cDNA Sequenz des GPR 56 Rezeptors der Ratte wurde identifiziert.

## Ergebnisse

Original Datenblatt aus NCBI-Datenbank Nr. AF529886

**LOCUS** AF529886 2949 bp mRNA linear ROD 15-AUG-2002

**DEFINITION** Rattus norvegicus G protein-coupled receptor 56 (Gpr56) mRNA, complete cds.

**ACCESSION** AF529886

**VERSION** AF529886.1 GI:22255985

**KEYWORDS** .

**SOURCE** Rattus norvegicus (Norway rat)

**ORGANISM** Rattus norvegicus

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;  
Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae;  
Rattus.

**REFERENCE** 1 (bases 1 to 2949)

**AUTHORS** Kuehnen,P. and Seufert,J.

**TITLE** Inhibition of rat serpentine receptor mRNA expression by leptin in insulin producing pancreatic beta-cells

**JOURNAL** Unpublished

**REFERENCE** 2 (bases 1 to 2949)

**AUTHORS** Kuehnen,P. and Seufert,J.

**TITLE** Direct Submission

**JOURNAL** Submitted (15-JUL-2002) Metabolism, Endocrinology and Molecular Medicine, Med. Poliklinik University of Wuerzburg, Klinikstrasse 6-8, Wuerzburg 97070, Germany

**FEATURES** Location/Qualifiers

source 1..2949

/organism="Rattus norvegicus"

/mol\_type="mRNA"

/db\_xref="taxon:10116"

/cell\_line="INS-1"

gene 1..2949

/gene="Gpr56"

CDS 290..2353

/gene="Gpr56"

/note="seven transmembrane receptor; secretin family; serpentine receptor"

/codon\_start=1

/product="G protein-coupled receptor 56"

/protein\_id="AAM94855.1"

/db\_xref="GI:22255986"

# Ergebnisse

## mRNA Sequenz:

```
1   agacagcgtg atccccgcct cccacgaagg cagctcttac taaccagggg agagatgcca
61  aaagtccacg gaggctgaag accctgtaaa gcttcgccag aaaacctagg agtggttcgag
121 ggcaacttggc accggaagct agacctgtag gcgagcctc acctggggtg agttcacagc
181 tgcctagaca ggctcagact aggtgctggg cacctggaag gaggaggcag aggcaccagc
241 agtaaaagcct atctatcaac agaagggcct gcctaggctt ggaggataaa tggctgtcca
301 ggtgctactg cagatggtct acttctactg gactctgctc tttctggtgc aaggtgccca
361 tggtgccagc ccccgagaag acttccgctt ctgtggccag cggaaaccaga cccaacagag
421 caccctccat tatgatcaaa cttcagagcc tcacatTTTT gtatggaaca cagacgagag
481 cctcacgatc cgtgccccat tcccggcagc ccagacatt cctacttct tcccgaacc
541 tagaggactc tatcatttct gcctctactg gagccgccac actgggaggc tccacctgcg
601 ctatggcaag aatgattacc tgcttagtag ccgagcctcc aaactcctct gctaccggaa
661 acaggaggag agcctgaaac agggggctcc actggttgcc acctctgtca gctcctggca
721 tagccaagtc aacaccagcc tggcgggctc tccaagcttc atcttctcct tcccgaatgc
781 cccacacaag gtctcccaca atgcatctgt gaacatgtgt gacctcaaga aggaactgca
841 gttgcttagc aagttcctgc agcatcctca caaggcctcc aagcggccct ccgcagcgtt
901 catcagtcag cagttgcaga acctggagtc aaagctgacc tccgtgagct tcctgggaga
961 cacactgtct tttgaggaga accgggtcaa tgccacagtg tggaaagctgc caccacagc
1021 cgggctggag gatctgcaaa tccactcca gcaggaggag gagcagagtg aggtccaggc
1081 ctactcogtg ttgcttcccc gggccgtatt ccagcagacc agaggccgtc gccgggatgc
1141 cgccaagagg ctctctggtag tcgacttcag cagccaagct ttgttcagg acaagaattc
1201 ctttgcaagt ctgatgggtg aggtcttggg tattgtcgtg cagaacacca aagcaaatgc
1261 cctctcagat cccgtggtac tcacctcca gcaccagcca cagccaaga acgtgactct
1321 gcagtgtgtg ttctggggtg aagaccggc atcaagcagc acagggagct ggagcagtga
1381 gggctgtgag actgttagca gagacacaca gacatcctgc ctgtgtaacc atctgacctc
1441 ctttgcaagt ctgatgggtg catccatgga ggtagaagcc actcacaaac actacctcac
1501 gctcctgtcc tacgtgggct gtgtcatctc tgccctagct tgtgtcttca ccatcgctgc
1561 gtacctgtgc accaggagga agtcacgtga ctacaccatc aaagtgcaca tgaacctgct
1621 tctggcogtc ttctcctggg acgtgagctt cctgctcagt gagccogtgg cgctgatggg
1681 ctctgaagca cctgtcgca ccagtgccat gttcctgcac ttctcctgc ttcctcctc
1741 ctctggatg ggctggagg gctacaatct ctaccgactg gtggtggagg tcttcggtac
1801 ctatgtccct ggctatctgc tcaagctgag cacctggggc tggggttttc ctgtcttctc
1861 ggtcactctg gtggcgttgg tggatgtgaa taactatggc cccatcatcc tagctgtgcg
1921 ccggactccg gaccatgtca tctaccctc tattgtcgtg atccgggact ctgtagttag
1981 ctatgtcact aaactgggcc tcttcagcct ggtgttctctg ttcaacatgg ctatgctggc
2041 caccatggtg gtgcagatcc tgcggcttcg cccacacagc cagaagtggc cccacgtgct
2101 gactttgctg ggctcagcc tggctcctgg ccttcctgg gccttggctc tcttttctt
2161 tgcttctggt acctccagc ttgtcatcat ctaccttttc agcatcatga ctctctcca
2221 aggttctctc atcttctgtg ggtactggtc catgaggttc caggccaag gcggtccctc
2281 tcctctgaag acaattcag acagcgccaa gctccccatc agctccggca gcacctctc
2341 cagccgcatc taggccaccg ccacacctcc cctcccctt ggggttgggg gtgcacatgc
2401 atggcgtctg ctcacattgt ctgtggcctg gtgctgtgcc cagccttggg tggtagtgg
2461 catactagag aaggccctgg tcttgaagg ggtaggactg ttgctctggt aggtagatat
2521 cctagcttgc cttggcgagt actgtggata cagcctactt ttcaaccag cattctgaag
2581 ccaagacgg caccctctgg tgacagtggc caagcttgat gctctctga gaagtggctc
2641 tcaaatccct gtgggtgtat ctgaagatac tgggcttgcc tgtcgtgaat tctgtcttc
2701 taacatacag tgaggggacc cccccgccc cccacgaaag ctctcacgaa gtctggagc
2761 tttaggcatg ggcctgagaa tccaggagga ctctctgcag gaggcagcgt tcatcttga
2821 cctcagcctt ctagtgggg aggaggatgt tcttttttaa agaccagttc atttgtctt
2881 tgatattaa gctctttgta gagagtttgg aaactgtagg agattgttga gaagaaaaat
2941 aaaaatcag
```

## Ergebnisse

Der Transkriptionsstart des GPR 56 Genes lag an Position 290 und endete an Position 2353. Die Gesamtlänge betrug 2949 bp.

In 92.9 % stimmte diese Rattensequenz von GPR 56 mit der Maus GPR 56 Serpentine Rezeptor- bzw. in 81.3 % mit der humanen GPR 56 Sequenz überein.

Die oben beschriebene Sequenz wurde in der NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) unter der Nummer AF529886 publiziert.

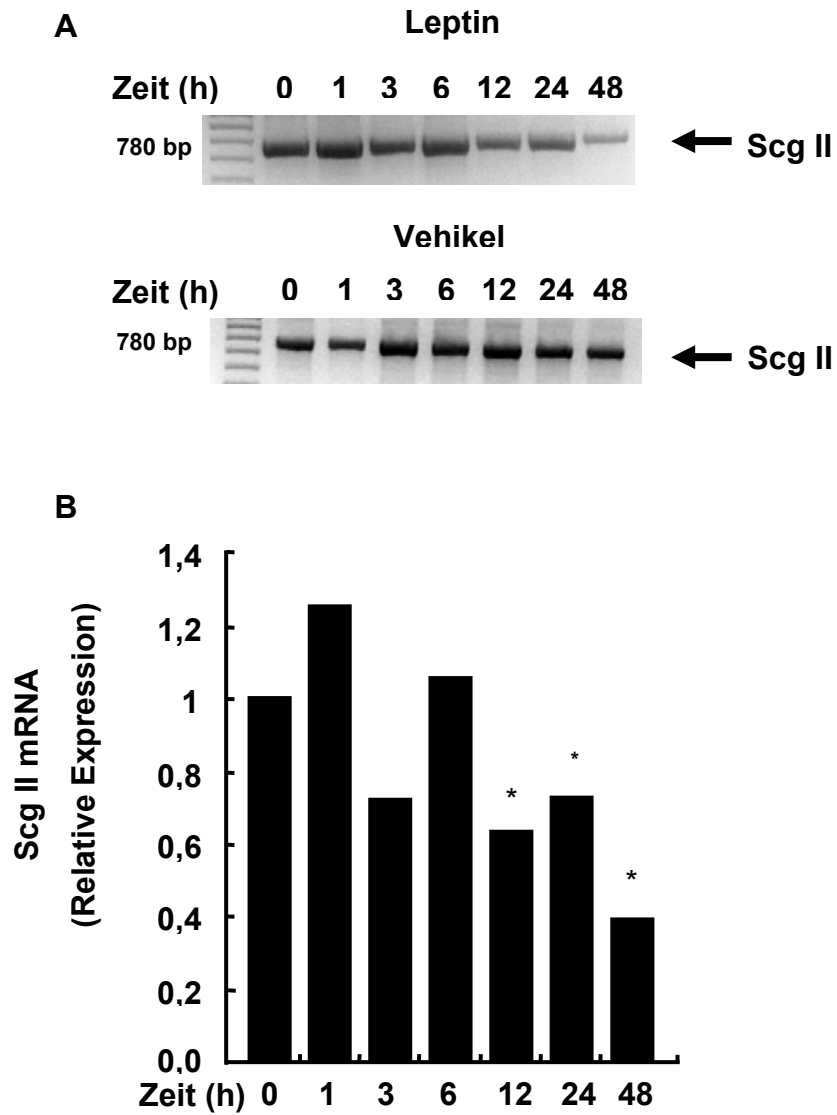
### **3.4 Secretogranin II (Scg II)**

#### 3.4.1 Regulation der mRNA- und Proteinexpression von Scg II

Die Regulation der mRNA-Expression in INS-1 Zellen durch 100 nM Leptin wurde mit semiquantitativer RT-PCR untersucht. Die relative mRNA-Expression wurde im Verhältnis zu Kontrollvehikel behandelten INS-1 Zellen gesetzt.

Leptin (100 nM) hemmte die Scg II mRNA-Expression um 88,8 % über 48 h (Abb 11).

## Ergebnisse

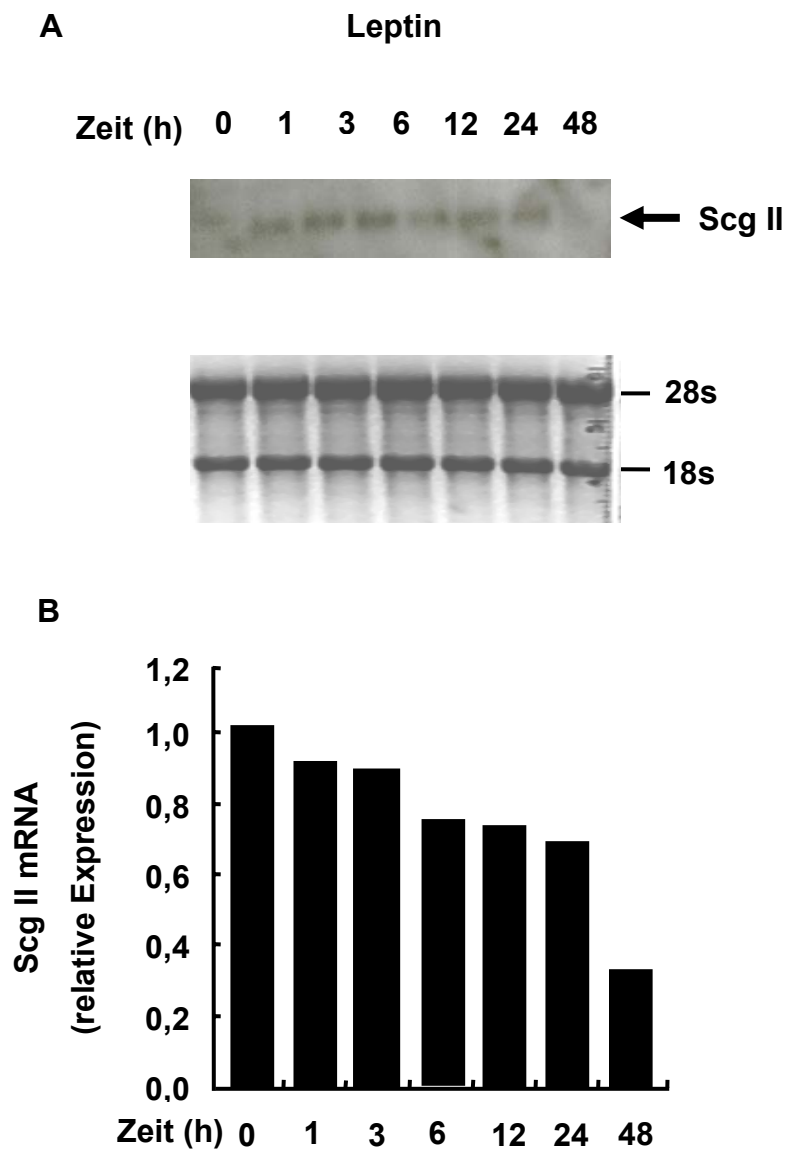


**Abbildung 11:** A: RT-PCR für Scg II nach Behandlung mit Leptin (100 nM) bzw. einem Kontrollvehikel; B: relative mRNA-Expression nach Leptinstimulation von Scg II in INS-1 Beta-Zellen im Vergleich zur Vehikelkontrolle ( $p < 0.0003$ ).

## Ergebnisse

Die Inhibition der mRNA-Expression von Scg II durch Leptin in INS-1 Zellen wurde mit Northern Blot Analysen bestätigt.

100 nM Leptin hemmte die mRNA-Expression nach 48 Stunden um 70 % im Vergleich zu einer 18s Kontrolle (Abb. 12).

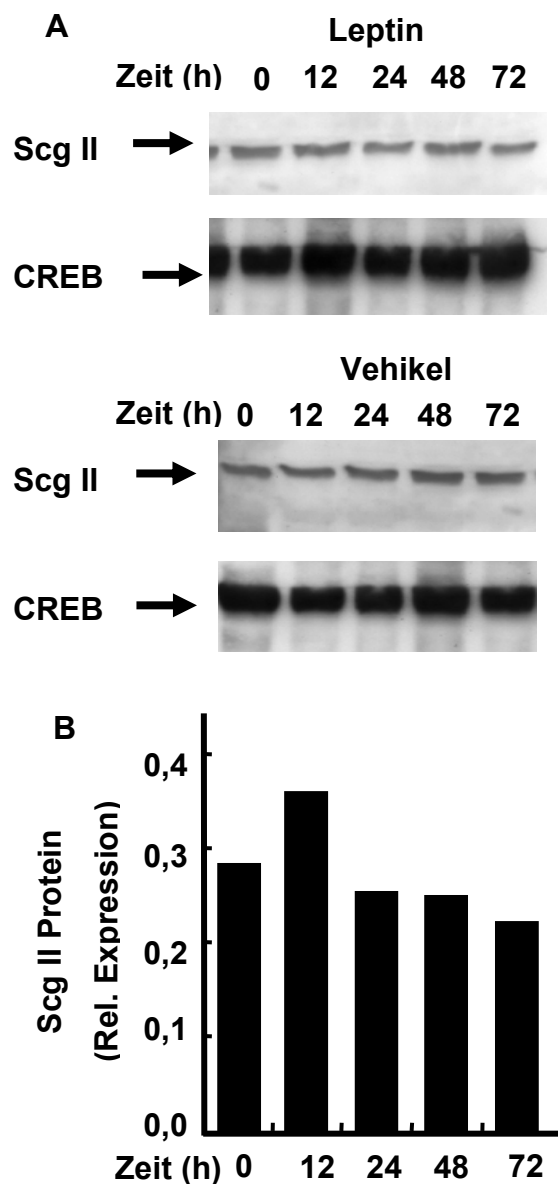


**Abbildung 12:** A: Northern Blot Analyse für Scg II nach Leptinstimulation und Formaldehydgel mit 28s und 18s; B: relative mRNA-Expression nach Leptinbehandlung im Verhältnis zu 18s über 48 h ( $p=0,3456$ ).

## Ergebnisse

Insgesamt konnte eine Hemmung der mRNA-Expression von Secretogranin II in der Beta-Zelle des endokrinen Pankreas der Ratte unter dem Einfluß von 100 nM Leptin nachgewiesen werden.

Leptin hemmte darüber hinaus die Proteinexpression in INS-1 Beta-Zellen. In Western-Blot Analysen mit einem Antiserum gegen Secretogranin II reduzierte Leptin (100 nM) die Proteinexpression über 72 h im Vergleich zu einer Vehikelkontrolle (Abb.13).



**Abbildung 13:** A: Western Blot mit Antiserum gegen Scg II und CREB; B: relative Proteinexpression von Scg II in Western Blot Analysen in INS-1 Zellen nach Leptinstimulation (100 nM) in Relation zur Vehikelkontrolle ( $p=1,406$ ).

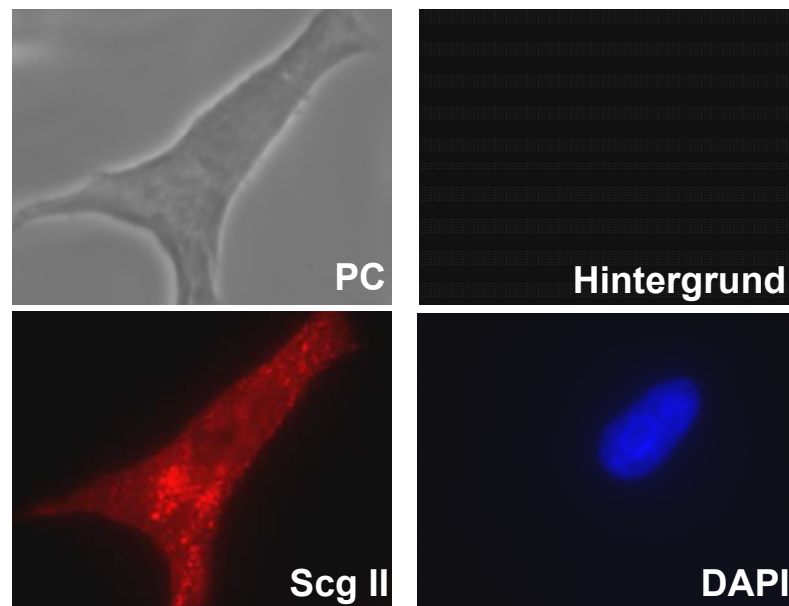


## Ergebnisse

### 3.4.2 Lokalisation von Scg II in INS-1 Zellen

Die Lokalisation von Secretogranin II in INS-1 Zellen der Ratte wurde mit immunzytochemischen Färbungen untersucht.

Secretogranin II war besonders in den Vesikeln des Zytoplasma in INS-1 Beta-Zellen lokalisiert. Im Kern, der durch DAPI (4,6-Diamino-2-Phenylindol) zusätzlich angefärbt wurde, wurde keine Expression nachgewiesen (Abb.14).



**Abbildung 14** Immunzytochemische Untersuchung an INS-1 Beta-Zellen mit einem Antiserum gegen Secretogranin II. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI.

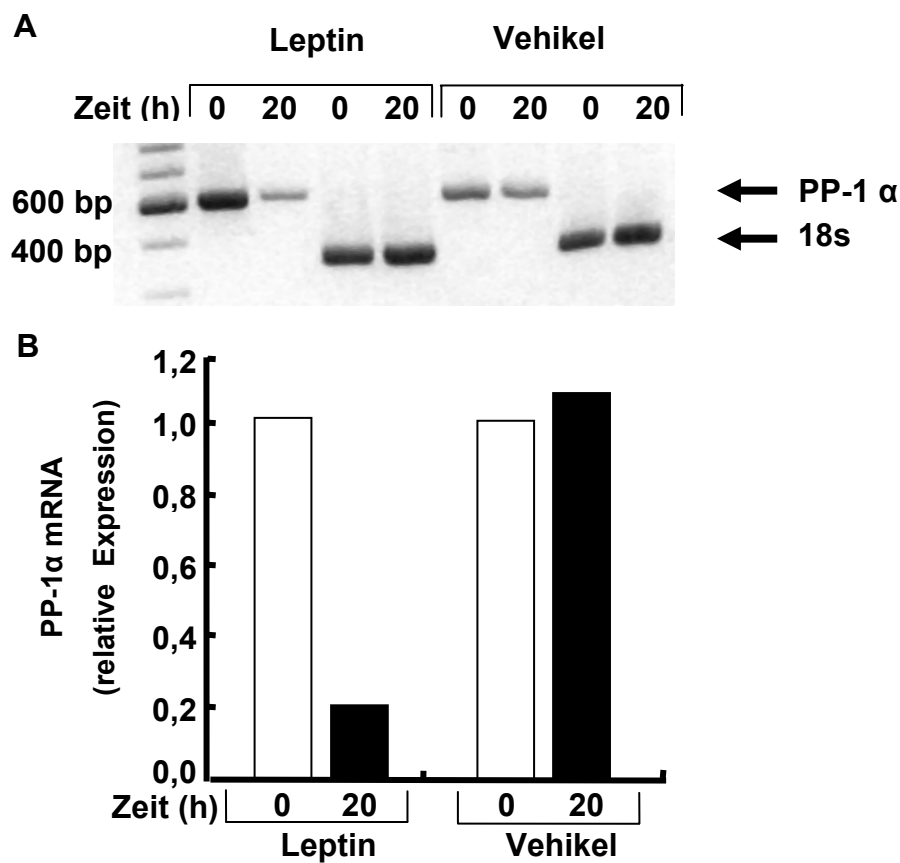
## Ergebnisse

### 3.5 Protein Phosphatase 1 $\alpha$

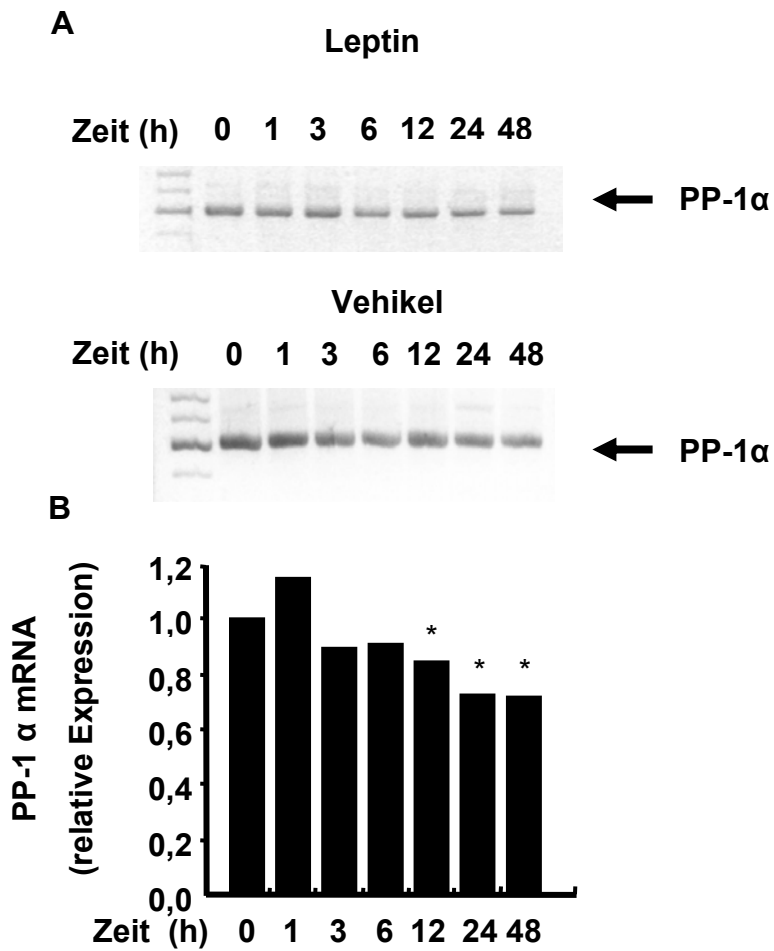
#### 3.5.1 Regulation der mRNA- und Proteinexpression

Die Regulation der mRNA- und Protein Expression von PP-1 $\alpha$ , einer katalytischen Untereinheit der Protein Phosphatase 1, wurde mit RT-PCR, Northern Blot- und Western Blot Analysen untersucht.

Leptin hemmte die mRNA-Expression in RT-PCR Untersuchungen von PP-1 $\alpha$  um 35 % in INS-1 Zellen im Vergleich zur Vehikelkontrolle (Abb.15-16).



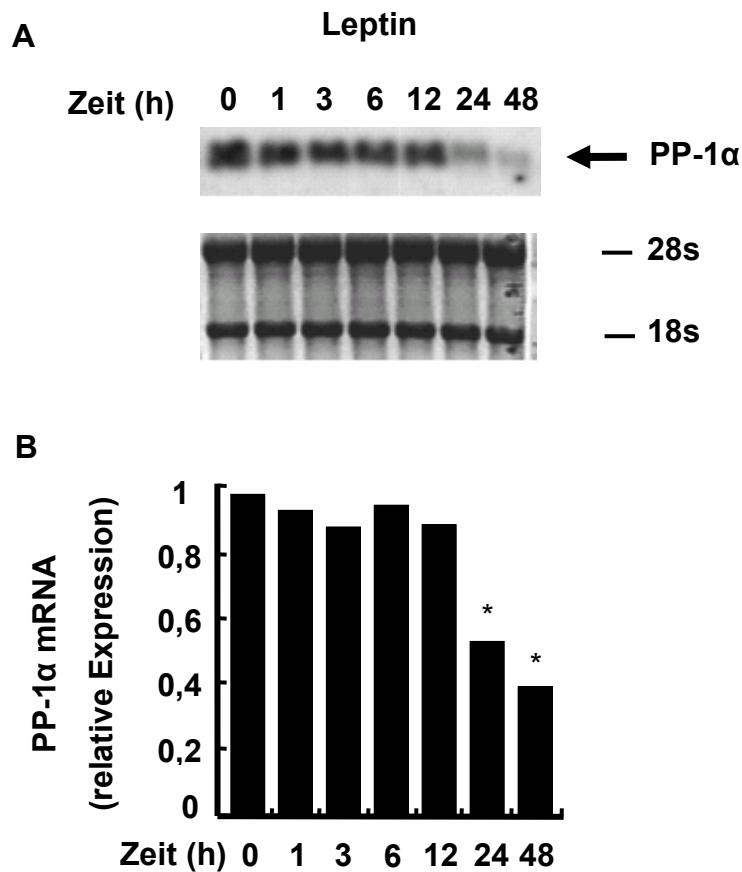
**Abbildung 15:** A: RT-PCR für PP-1 $\alpha$  und 18s nach Behandlung mit Leptin (100 nM) bzw. Kontrollvehikel; B: Relative mRNA-Expression von PP-1 $\alpha$  nach Leptinstimulation (100 nM) und Behandlung mit Kontrollvehikel im Verhältnis zur 18s Kontrolle .



**Abbildung 16:** A: RT-PCR für PP-1α nach Stimulation mit 100 nM Leptin bzw. nach Behandlung mit Kontrollvehikel; B: relative mRNA-Expression von PP-1α mit RT-PCR in INS-1 Zellen nach Leptinstimulation (100 nM) im Vergleich zu einer Behandlung mit einem Kontrollvehikel (p=0,0006).

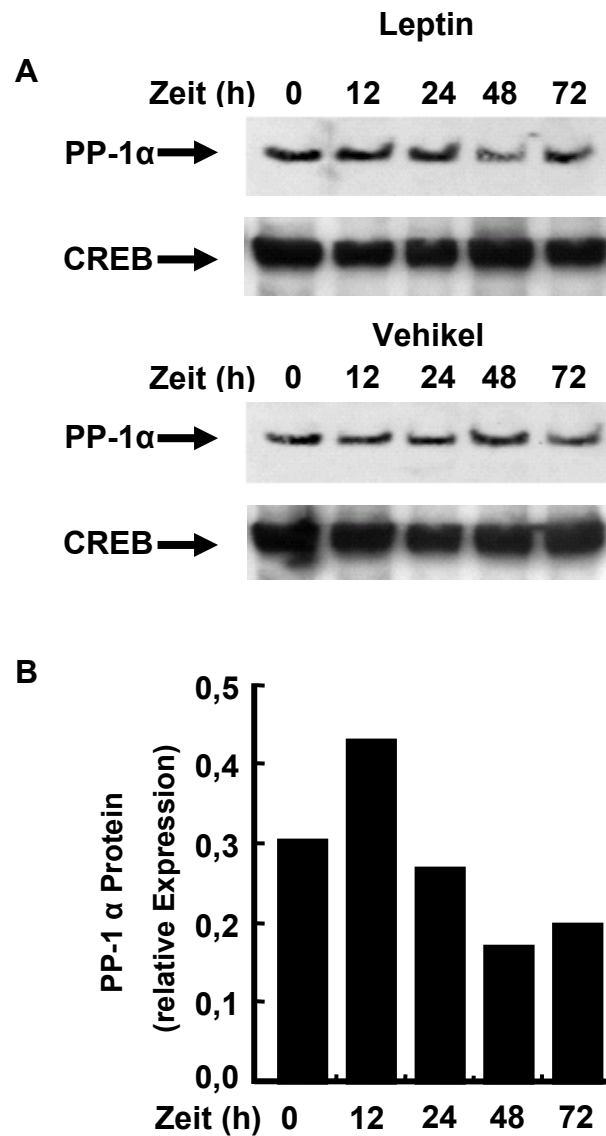
Die Ergebnisse der RT-PCR wurden mit Northern Blot Analysen bestätigt. 100 nM Leptin hemmten die mRNA-Expression in INS-1 Zellen von PP-1α um 35 % nach 48 Stunden (Abb.17).

## Ergebnisse



**Abbildung 17:** A: Northern Blot und Formaldehydgel von PP-1 $\alpha$  und 18s- bzw. 28s-Kontrolle; B: relative mRNA-Expression in Northern Blot Analysen nach Leptinstimulation (100 nM) von INS-1 Beta-Zellen im Vergleich zur 18s Kontrolle auf Formaldehydgel ( $p=0,0001$ ).

In Western Blot Analysen konnte eine Hemmung der Proteinexpression in INS-1 Zellen um 35,5 % nach einer Leptinstimulation mit 100 nM über 72 h im Vergleich zu einer Vehikelkontrolle nachgewiesen werden (Abb.18).



**Abbildung 18:** A: Proteinexpression in Western Blot Analysen mit Antikörper gegen PP-1 $\alpha$  im Verhältnis zu einer Vehikelkontrolle in INS-1 Beta-Zellen, B: relative Proteinexpression im Vergleich zu Kontrollvehikelbehandlung ( $p=0,5496$ ).

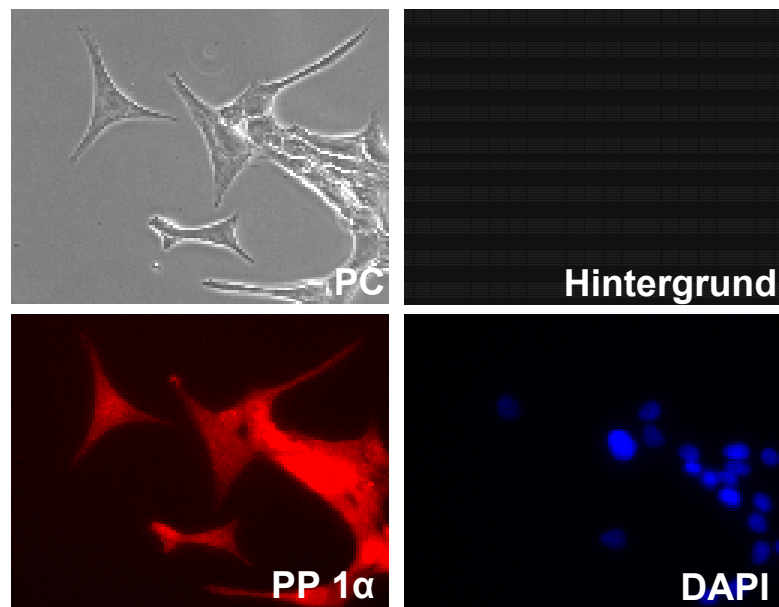
Leptin (100 nM) hemmte in INS-1 Zellen sowohl die mRNA-Expression als auch die Proteinexpression von PP-1 $\alpha$  in RT-PCR, Northern Blot- und Western Blot Analysen.

## Ergebnisse

### 3.5.2 PP-1 $\alpha$ Lokalisation in INS-1 Zellen und humanen Pankreasinseln

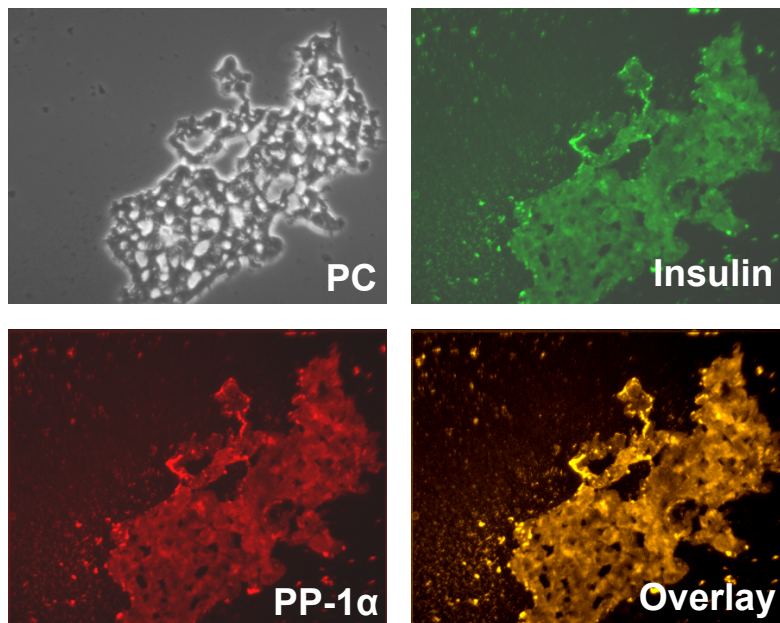
Die Lokalisation in INS-1 Zellen von PP-1 $\alpha$  wurde mit immunzytochemischen Färbungen untersucht.

Mit einem Antiserum gegen PP-1 $\alpha$  wurde in INS-1 als auch in humanen Pankreasinseln PP-1 $\alpha$  im Kern als auch im Zytoplasma identifiziert. Der Zellkern wurde mit DAPI angefärbt (Abb.19-20).



**Abbildung 19:** Untersuchung der Lokalisation von PP-1 $\alpha$  durch immunzytochemische Färbungen von INS-1 Beta-Zellen mit einem Antiserum gegen PP-1 $\alpha$  und DAPI.

## Ergebnisse



**Abbildung 20:** Immunzytochemische Färbungen von humanen Pankreasinseln mit Antisera gegen Insulin und PP-1 $\alpha$  und im Overlay als Doppelfärbung.

In humanen Pankreasinseln war PP-1 $\alpha$  kolokalisiert mit Insulin. Dieses Ergebnis wurde in humanen Pankreasinseln mit einer Doppelfärbung gegen Insulin und PP-1 $\alpha$  nachgewiesen (Abb.20).

### 3.5.3 Insulinsekretion

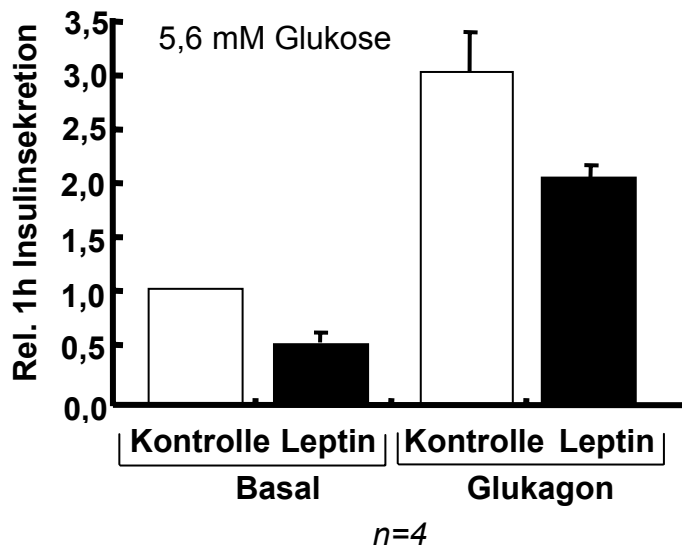
Es war beschrieben worden, dass PP-1 von Glukagon reguliert wurde.

Glukagon förderte in Untersuchungen die Insulinsekretion der Beta-Zelle, während Leptin die Insulinsekretion hemmte [128].

Mit einem Insulin-ELISA wurde die Insulinsekretion von INS-1 Zellen gemessen. INS-1 Beta-Zellen wurden mit 100 nM Leptin über 2 Stunden, 40  $\mu$ mol Glukagon über 1 Stunde und gleichzeitig mit beiden Hormonen Leptin (100 nM) und Glukagon (40  $\mu$ mol) behandelt.

Leptin hemmte die Insulinsekretion um 38,3 %  $\pm$  0,03 und Glukagon steigerte die Insulinsekretion von INS-1 Beta-Zellen um 134 %  $\pm$  0,17. Des Weiteren wurde die Glukagon induzierte Insulinsekretion in INS-1 Beta-Zellen durch Leptin um 84,4 %  $\pm$  0,09 reduziert (Abb.21).

## Ergebnisse



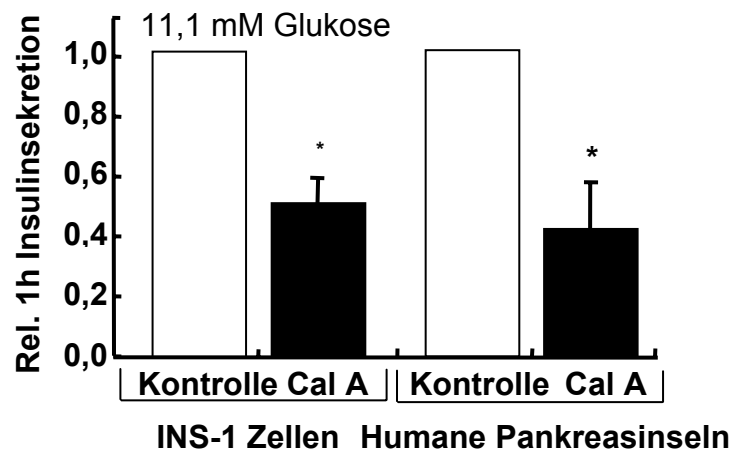
**Abbildung 21:** Insulin ELISA zur Detektion der Insulinsekretion von INS-1 Beta-Zellen nach Stimulation durch 100 nM Leptin und 40  $\mu$ M Glukagon.

Calyculin A (Cal A) ist ein spezifischer Inhibitor von PP-1 $\alpha$ .

Die Insulinsekretion von INS-1 Zellen wurde nach Stimulation mit 40 nM Calyculin A über 1 Stunde um 59 %  $\pm$  1,04 bei einer Glukosekonzentration von 11,1 mM gehemmt.

Eine Hemmung der Insulinsekretion wurde auch in humanen Pankreasinseln nach einer Stimulation mit Cal A über 1 Stunde beobachtet. Cal A reduzierte die Insulinsekretion um 61 %  $\pm$  0,4 (Abb. 22).





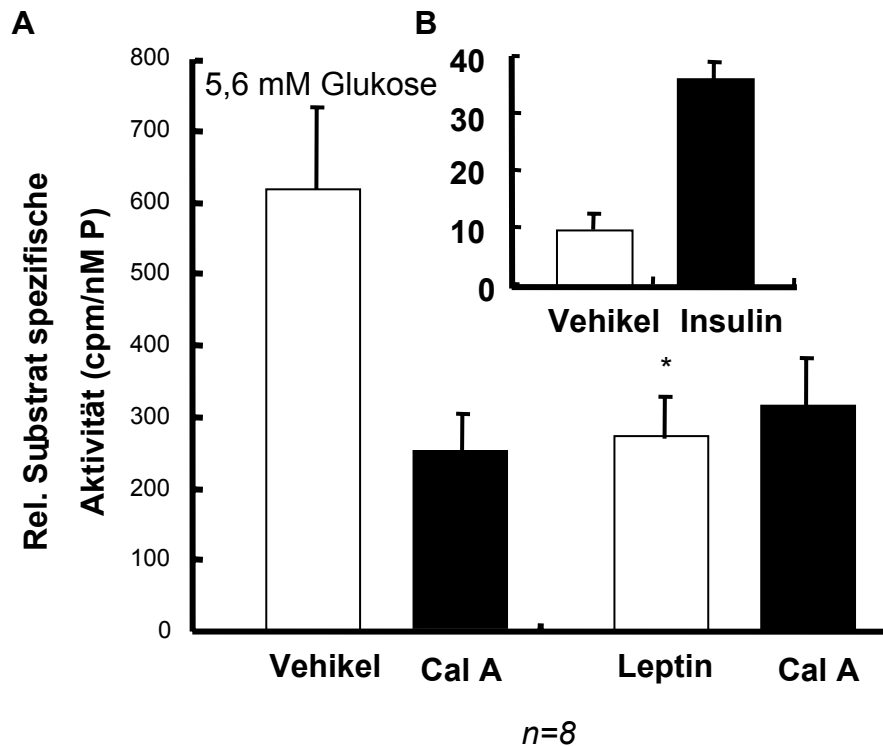
**Abbildung 22:** Insulin ELISA zur Messung der Insulinsekretion von INS-1 Zellen ( $p=0,3906$ ) und humanen Pankreasinseln ( $p=0,5403$ ) nach Stimulation mit  $40 \mu\text{M}$  Cal A über 1 h im Vergleich zur Vehikelkontrolle.

#### 3.5.4 PP-1 Enzymaktivität

Um den direkten Einfluss von Leptin auf die Enzymaktivität der Protein Phosphatase 1 zu untersuchen, wurde ein spezifischer PP-1 Assay durchgeführt.

In bereits publizierten Arbeiten wurde nachgewiesen, dass Insulin in Hepatozyten die Enzymaktivität von PP-1 stimuliert und so zu einer Aktivierung der Glykogen Synthase und zu einer glukosespeichernden Wirkung führte [126]. Aus diesem Grunde wurde als Kontrollexperiment die Wirkung von  $100 \text{ nM}$  Insulin auf die PP-1 Enzymaktivität in Hep-G2 Leberzellen untersucht. Nach Behandlung mit Insulin wurde die PP-1 Enzymaktivität um das vierfache nach 2 Stunden gesteigert [126] (Abb. 23).

## Ergebnisse



**Abbildung 23:** A: PP-1 Enzymassay mit INS-1 Beta-Zellen nach einer Stimulation mit 100 nM Leptin über 1 h mit und ohne Zugabe von 40  $\mu$ M Cal A. B: Kontrolle mit Hep-G2 Zellen nach einer Stimulation mit 100 nM Insulin.

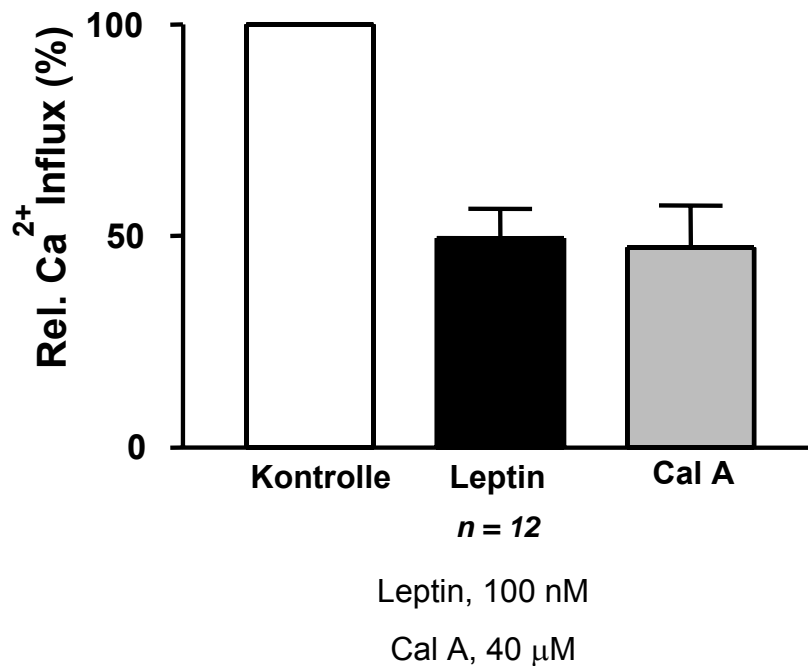
INS-1 Beta-Zellen wurden mit 100 nM Leptin über eine Stunde stimuliert bzw. mit einem Kontrollvehikel behandelt.

Die PP-1 Enzymaktivität wurde durch Leptin um 64 %  $\pm$  58,5 reduziert. Diese hemmende Wirkung konnte imitiert werden, durch Zugabe von Cal A in den Vehikel- bzw. in den Leptin stimulierten Ansatz (Abb. 23).

### 3.5.5 Messung des Kalzium-Influx in INS-1 Zellen

In zahlreichen Untersuchungen wurde die Wirkung von PP-1-Inhibitoren auf spannungsabhängige Kalziumkanäle untersucht. In intestinalen Muskelzellen wurde eine Stimulation sowie eine Hemmung der Kalzium-Kanalaktivität nach einer Behandlung mit Cal A beobachtet.

## Ergebnisse



**Abbildung 24:** Kalzium-Influx in INS-1 Beta-Zellen nach Stimulation mit 100 nM Leptin und 40 μM Cal A.

In der vorliegenden Arbeit wurden INS-1 Zellen mit 40 μM Cal A und 100 nM Leptin über 1 h behandelt.

Nach einer Stimulation mit Leptin bzw. Cal A wurde eine Hemmung des Kalzium-Influxes in INS-1 Zellen um etwa 50 % im Vergleich zu einer Vehikelbehandlung mit der FURA2 Methode beobachtet. Damit war eine Hemmung des Kalzium-Influx in INS-1 Beta-Zellen mit einer Inhibition von PP-1α durch Cal A assoziiert (Abb. 24).

## 4 Diskussion

### 4.1 Regulation der mRNA Expression durch Leptin in INS-1 Beta-Zellen

Leptin, produziert im Fettgewebe, hemmt die Insulinsekretion der Beta-Zelle des endokrinen Pankreas. Umgekehrt fördert Insulin die Leptinsekretion der Adipozyten. Dieser Regelkreis führte zu dem Modell der adipoinsulären Achse [90].

Die Wirkung von Leptin wird durch Regulation verschiedener Signalwege vermittelt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, weitere Leptin regulierte Gene in der Beta-Zelle des endokrinen Pankreas zu identifizieren und somit weitere Einblicke in die Leptin vermittelte Hemmung der Insulinsekretion in der Beta-Zelle zu erhalten.

In publizierten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Leptin die mRNA-Expression von Insulin in der Beta-Zelle hemmt [89, 99, 100, 129].

Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit mit RT-PCR Analysen in INS-1 Zellen reproduziert werden.

Darüber hinaus wurden weitere Gene, insbesondere des JAK/STAT Signalweges, mit RT-PCR-Analysen untersucht. Bis auf die mRNA-Expression von NeuroD1, konnte dabei keine Regulation der mRNA-Expression nach Stimulation mit Leptin in INS-1 Beta-Zellen nachgewiesen werden.

### 4.2 NeuroD1

In den Untersuchungen konnte mit semiquantitativer RT-PCR eine Hemmung der mRNA-Expression des Gens für NeuroD1 beobachtet werden.

Bei Neuro D handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor aus der Gruppe der Helix-loop-Helix Proteine (bHLH), die bei der embryonalen Entwicklung des endokrinen Pankreas von Bedeutung sind [130]. NeuroD1 reguliert den Insulin- und Pax 4 Promotor im endokrinen Pankreas [131, 132]. Insgesamt ist diese Regulation von einem DNA bindenden Komplex aus Pdx1, Pan 1 (E47), dem Koaktivator p300 und weiteren, teilweise noch unbekanntem Faktoren, abhängig [132]. Dieser Komplex

## Diskussion

stimuliert den Insulinpromoter in der Beta-Zelle des endokrinen Pankreas [133]. Knockout Mausmodelle für das Gen NeuroD1 zeigen eine gestörte Pankreasentwicklung [134].

Darüber hinaus ist eine Mutation im Gen NeuroD1 mit der Entwicklung des MODY Typ 6 Diabetes vergesellschaftet [134, 135]. Dies ist eine Diabetesform, die durch eine eingeschränkte Insulinsekretion der Beta-Zelle gekennzeichnet ist.

In INS-1 Beta-Zellen hemmt Leptin (100 nM) die mRNA-Expression von NeuroD1 nicht signifikant. Möglicherweise reguliert Leptin die Insulinsekretion durch eine Hemmung der mRNA-Expression von NeuroD1 und reduziert die stimulierende Wirkung von NeuroD1 auf den Insulinpromotor.

### 4.3 GPR 56

Bei dem GPR 56 Serpentine Rezeptor handelt es sich um einen 7-transmembranären, G-Protein-gekoppelten Orphan-Rezeptor. Er gehört zur Klasse-B-Sekretin-Familie, zu der auch die Rezeptoren für GLP-1, Glukagon und Vasointestinales Peptid (VIP) zählen, welche als Kandidatengene für die Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 2 diskutiert wurden [19, 136, 137].

Die GPR 56 Expression wurde besonders in humanem Schilddrüsengewebe und im Hypothalamus und Hypocampus von Ratten lokalisiert [138].

Bisher wurde kein Ligand für diesen Rezeptor identifiziert [136, 137].

In Expressionsanalysen mit Northern Blot wurde GPR 56 zum größten Anteil im Pankreas, Plazenta, Leber und in der Niere nachgewiesen. In der funktionellen Charakterisierung führte eine Überexpression von GPR 56 zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB und PAI-1. Aus diesem Grunde wurde GPR 56 eine Funktion bei der Bildung des Zytoskelettes und der Zelladhäsion zugeschrieben [138].

Mutationen im Gen für den GPR 56 Rezeptor wurden beim Menschen im Zusammenhang mit einer benignen familiären Polymikrogyrie gefunden [139], eine Erkrankung mit Entwicklungsverzögerung, zerebellarer Ataxie und neuraler Migrationsstörung.

In der vorliegenden Arbeit wurde der GPR 56 Rezeptor in INS-1 Zellen nachgewiesen und die Rattensequenz dieses Rezeptors identifiziert und unter der Nummer AF529886 in der NCBI-Datenbank publiziert.

## Diskussion

Eine Regulation der mRNA-Expression von GPR 56 durch Leptin konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Die Funktion von GPR 56 in der Beta-Zelle des endokrinen Pankreas ist bisher ungeklärt.

### 4.4 Secretogranin II

Secretogranin II (Scg II) gehört mit Chromogranin A und B zur Gruppe der Chromogranine. Bei der Ratte ist das Scg II Gen auf Chromosom 9 und beim Menschen auf Chromosom 2 lokalisiert.

Erstmals wurde Secretogranin II von Rosa und Zanini 1981 im Hypophysenvorderlappen beschrieben [140]. Darüber hinaus zeigte sich eine Expression von Scg II in zahlreichen neuroendokrinen Organen, wobei die höchste Konzentration im Gastrointestinaltrakt und im Hypothalamus nachgewiesen wurde [141, 142].

Durch proteolytische Prozesse entstehen aus Scg II drei Proteine: LA-42 [143], das Pentapeptid AM-5 [144], wobei für beide Produkte bisher keine Funktion gefunden werden konnte, und Secretoneurin [145]. Secretoneurin ist ein Neuropeptid und vermittelt u.a. die Dopaminsekretion im ZNS. Bisher ist noch kein Rezeptor für Secretoneurin identifiziert worden.

Scg II stimuliert die Gonadotropinsekretion in der Hypophyse, hemmt die Serotonin- und Melatoninsekretion in Pinealozyten, wirkt chemotaktisch auf Monozyten, Eosinophile und Fibroblasten, stimuliert die Migration von Endothelzellen und aktiviert die Adhäsion von Neutrophilen [142].

Es wurde eine Regulation von Scg II durch Östrogen und Histamin beobachtet. Die Expression von Scg II wurde in Untersuchungen durch Östrogen gehemmt. In GH4C1 Prolaktinomzellen wurde eine Reduktion der mRNA-Expression um 30 % unter dem Einfluss von Östrogen beobachtet [146].

Nach einer Ovariectomie wurde die mRNA-Expression von Scg II in der Hypophyse um das zwei- bis dreifache gesteigert. Bei anschließender Östrogensubstitution kam es zu einer Reduktion der mRNA-Expression [147-149].

Eine Reduktion der mRNA-Expression nach einer Ovariectomie wurde ebenfalls nach Gabe eines GnRH Agonisten beobachtet [149].

## Diskussion

Histamin reguliert ebenfalls Scg II. Nach einer Stimulation mit Histamin wurde die mRNA-Expression in chromaffinen Zellen im ZNS [150] verdoppelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde Scg II in Vesikeln von INS-1 Beta-Zellen mit immunzytochemischen Färbungen nachgewiesen. Leptin hemmte in INS-1 Zellen die mRNA-Expression von Scg II nach 48 Stunden. Diese Regulation wurde mit RT-PCR und Northern Blot Analysen nachgewiesen.

Des Weiteren wurde eine Hemmung der Scg II Proteinexpression nach 72 Stunden beobachtet.

Secretogranin II ist Teil der Protein-Kinase A und Protein-Kinase C Signalwege und besitzt eine cAMP Bindungsstelle [142, 151].

In chromaffinen Zellen beim Rind wurde die Scg II mRNA-Expression über eine Aktivierung des cAMP abhängigen Proteinkinase-Signalweges mit Forskolin um das 3.5 fache gesteigert [152].

Möglicherweise reguliert Leptin über eine Inhibition von Scg II die Insulinvesikelbildung und führt so zu einer Reduktion der Insulinsekretion.

In Patienten mit einem Prader-Willi-Syndrom, welches sich durch Hyperphagie, Adipositas, Hypogonadismus, Kleinwuchs und mentaler Retardierung auszeichnet, wurde Scg II als ein unterschiedlich reguliertes und exprimiertes Gen im Vergleich zur gesunden Population identifiziert [153]. Aufgrund dieser Untersuchung wurde Scg II als potentielles Kandidatengen für die Entwicklung von Adipositas diskutiert.

Abgesehen von Untersuchungen im ZNS und an Prader-Willi-Patienten, wurde in einer Studie die Genexpression von Ratten-Beta-Zellen nach normaler und niedriger Proteinzufuhr mit Mikroarray-Analysen verglichen.

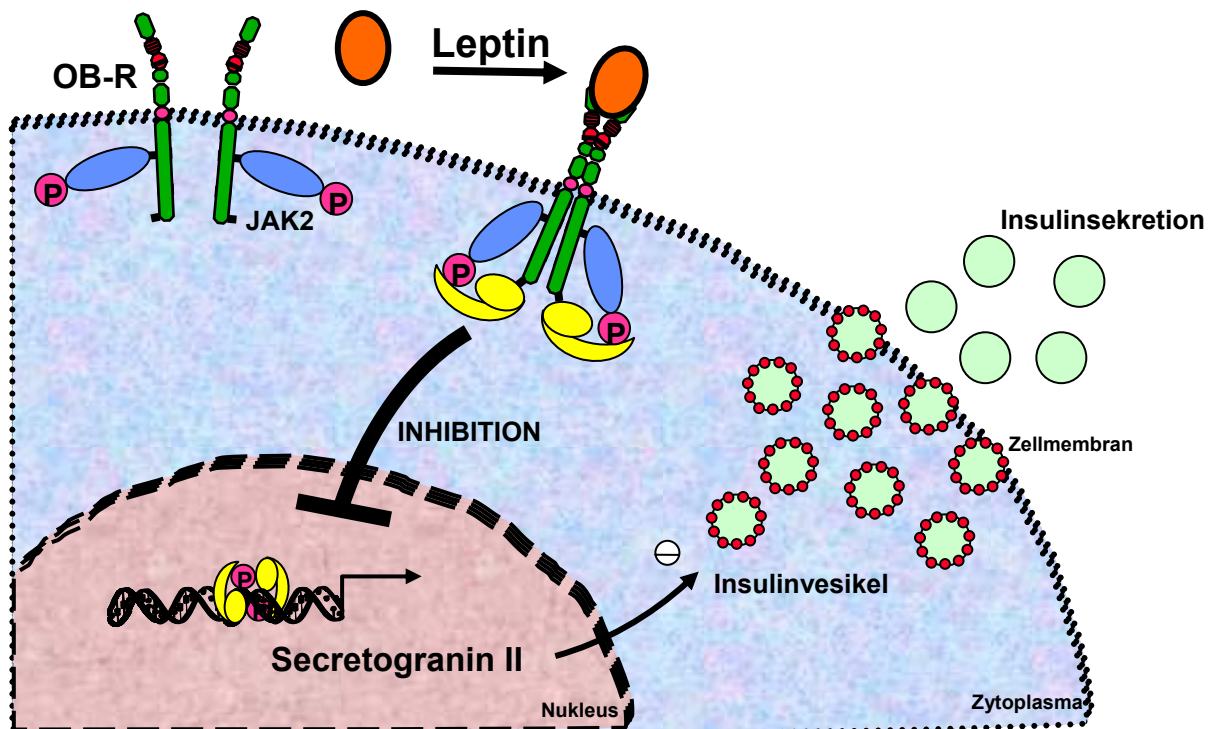
In dem cDNA-Mikroarray wurde Scg II als differenziell exprimiertes Protein und als bedeutendes Protein für die Insulinsekretion der Beta-Zelle des endokrinen Pankreas beschrieben [154].

Die Scg II Genexpression wurde in der vorliegenden Arbeit von Leptin in INS-1 Beta-Zellen reguliert.

Aufgrund dieser Ergebnisse und den bisher publizierten Untersuchungen, kann die hemmende Wirkung von Leptin auf die Insulinsekretion der Beta-Zelle zum Teil über

eine Regulation von Scg II vermittelt sein (Abb.25).

Inwieweit beispielsweise im ZNS Leptin die Scg II Expression reguliert, ist ungeklärt. Eine Fehlregulation der Scg II Genexpression durch Leptin kann möglicherweise zu der Entwicklung einer Insulinsekretionsstörung führen.



**Abbildung 25:** Modell der Leptin vermittelten Hemmung der Insulinsekretion durch Inhibition der mRNA- und Proteinexpression von Scg II.

#### 4.5 Protein Phosphatase 1 (PP-1)

Die Kontrolle ein Drittel aller Proteine in eukaryontischen Zellen vollzieht sich über eine meist reversible Phosphorylierung spezifischer Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Reste. Inwieweit ein Protein dabei phosphoryliert wird, ist abhängig von einem Gleichgewicht zwischen Protein-Kinasen und Protein-Phosphatasen. Man geht davon aus, dass es etwa 100 verschiedene Tyrosin-Kinasen bzw. Tyrosin-Phosphatasen und etwa 400 Serin/Threonin Kinasen aber nur etwa 25 verschiedene Serin/Threonin Phosphatasen gibt [155].



## Diskussion

Die Gruppe der Protein Serin/Threonin Phosphatasen wird in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe der PPM-Familie besteht aus  $Mg^{2+}$  abhängigen Enzymen wie z.B. Protein Phosphatase 2C (PP-2c). Die zweite Gruppe der FCP-Familie ist ebenfalls  $Mg^{2+}$  abhängig. Die dritte Gruppe der PPP-Familie wird unterteilt in vier Subgruppen PP-1, PP-2A (mit PP-4 und PP-6), PP-2B und PP-5 [155-158].

PP-1 hat eine Größe von 35-38 kDa und besitzt drei Isoformen PP-1 $\alpha$ , PP-1 $\gamma$  und PP-1 $\beta/\delta$ . PP-1 besteht aus einer katalytischen Untereinheit und ein bzw. zwei zusätzlichen regulatorischen Untereinheiten. Auf diese Weise entsteht ein Multimer, welches in der Lage ist, verschiedene Funktionen und verschiedene Zielproteine zu regulieren (Tab. 3) [155, 159].

AKAIs	Gip1	Nek2	Proteinkinase R	Sds22
AKAP149	Grp78	Neurabins	PNUTS	Sla1
AKAP220	Hox 11	NeurofilamentL	PP-1bp80	SNF5
AKAP450	PP2a inhibitor	NKCC1	PSF	SNP70
ASPPs	Inhibitor 2	NIPP1	Regs	Tau
Aurora Kinase	Inhibitor 3	Pan1	Rp L5	staußen
DARPP-32	Klp38B	PHIs	Ripp1	Trithorax
Focal adhesion kinase	Mypts	Phosphofruktokinase	SARAs	TIMAPs
GADD34	N-CoR	PRIP-1	Scd5	Vit. D Rezeptor

**Tabelle 3:** Darstellung der Proteinen, welche mit PP-1 als regulatorische Untereinheiten interagieren [155].

Regulatorische Untereinheiten binden an unterschiedlicher Position an PP-1.

Der „RVXF“ bindende Kanal, der sich aus zwei zentralen  $\beta$ -Faltblatt Strukturen zusammensetzt, ist eine charakterisierte Bindungsstelle.

Die meisten regulatorischen Untereinheiten besitzen ein RVXF-Motiv. Dieses Motiv hat die Funktion eines Ankers an PP-1, der gleichzeitig eine weitere Bindung zwischen regulatorischer und katalytischer Untereinheit an PP-1 ermöglicht [158, 160-162].

Die unterschiedlichen regulatorischen Untereinheiten von PP-1 beeinflussen die Affinität von PP-1 zu verschiedenen Substraten [155].

Die Funktion von PP-1 wird mit dem Zellzyklus, intrazellulärem Transport, Proteinsynthese und Muskelrelaxation in Verbindung gebracht. Darüber hinaus ist

## Diskussion

PP-1 ein Schlüsselenzym in der Insulinsignalkaskade. Eine Aktivierung durch Insulin führt zu einer Stimulation der Glykogensynthese in Hepatozyten [163-165].

Zusätzlich ist PP-1 in der Lage, unterschiedliche Kanalproteine, wie den Kalzium Kanal oder den Na-K-Cl-Kotransporter zu regulieren [166]. PP-1 wird direkt oder indirekt durch Insulin, Glukagon,  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenergen Agonisten, Glukokortikoide und Thyroxin reguliert [155, 167].

Die katalytische Untereinheit PP-1 $\alpha$  besteht aus 330 Aminosäuren und wird beim Menschen auf Chromosom 11 kodiert, bei der Ratte auf Chromosom 1 und bei der Maus auf Chromosom 7 [168]. PP-1 $\alpha$  wird besonders im ZNS, im Herzen, Leber, Niere, Milz, Lunge, Skelettmuskel, Pankreas und Intestinaltrakt exprimiert [169, 170]. PP-1 $\alpha$  enthält ein zentrales  $\beta$ -Faltblatt Element mit zwei Metallbindungsstellen für Fe<sup>2+</sup> und Zn<sup>2+</sup> [160, 162, 171].

Es wurden bisher zahlreiche PP-1 $\alpha$  Inhibitoren identifiziert. Okadaic-Säure (OA), benannt nach Yaichiro Okada und extrahiert aus der Schwammart Halichondria okadi, hemmt PP-1, PP-2A und PP-2B [172, 173].

Calyculin A (Cal A), ein weiterer PP-1 $\alpha$  Inhibitor, ist ein Produkt der Schwammart Discodermia Calyx und hemmt PP-1 $\alpha$ , indem es eine Phosphatgruppe an die Metallbindungsstelle von PP-1 bindet [171, 174]. Weitere PP-1 $\alpha$  Inhibitoren sind Mykrozystin, Nodularin, Tautomycin, Ciclosporin, Cypermethrin und Heparin [175].

Die Wirkung von PP-1 $\alpha$  Inhibitoren auf die Insulinsekretion der Beta-Zelle wurde in zahlreichen Studien untersucht. In den durchgeführten Untersuchungen wurde sowohl eine Stimulation als auch eine Hemmung der Insulinsekretion beobachtet [176-185]. Dabei konnte in unterschiedlichen Untersuchungen gezeigt werden, dass Cal A bzw. OA die glukoseinduzierte Insulinsekretion hemmen [185].

In der vorliegenden Arbeit wurde in INS-1 Beta-Zellen und in humanen Pankreasinseln eine Hemmung der Insulinsekretion nach einer Stunde durch eine Behandlung mit Cal A beobachtet. Des Weiteren hemmte Leptin die mRNA- und Protein-Expression und die Enzymaktivität von PP-1 $\alpha$  in INS-1 Beta-Zellen. Da diese Wirkung, durch eine Stimulation mit Cal A imitiert, zu einer Hemmung der Insulinsekretion führte, wurde postuliert, dass die bekannte hemmende Wirkung von

## Diskussion

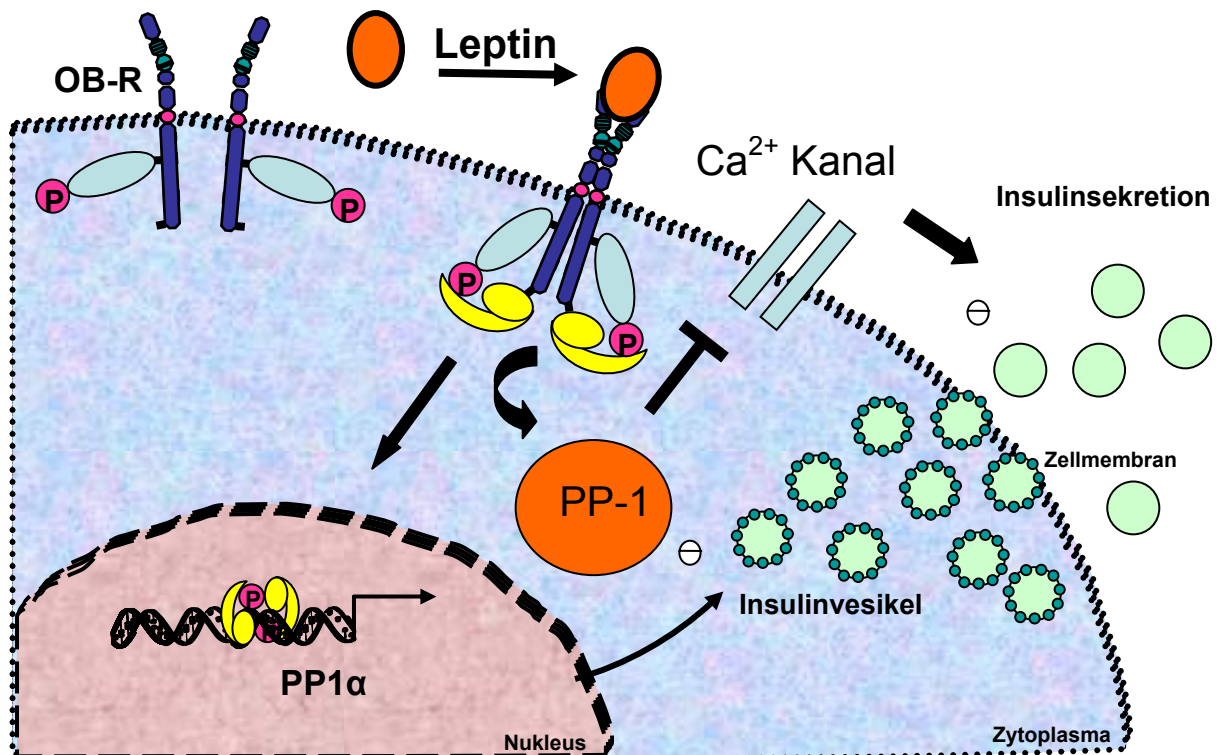
Leptin auf die Insulinsekretion der Beta-Zelle teilweise durch eine Hemmung der Expression von PP-1 $\alpha$  vermittelt wurde [102].

Es wurde in verschiedenen Geweben die Wirkung einer PP-1 Hemmung auf den Kalzium-Influx der Zelle untersucht [166, 167]. In der Beta-Zelle wurde dabei sowohl eine Hemmung des Kalzium-Influges als auch eine Steigerung beobachtet [178, 183, 184]. Diese kontroversen Beobachtungen wurden mit der Gewebewahl, den verwendeten PP-1 Inhibitoren, der untersuchten Kanal-Isoform und der Beobachtungsdauer begründet. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass die cAMP- und Glukosekonzentration für die Bestimmung des Kalzium-Influges von Bedeutung ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Hemmung des Kalzium-Influges in INS-1 Beta-Zellen nach einer Inhibition von PP-1 $\alpha$  durch Cal A beobachtet. Dieses Ergebnis wird durch weitere Studien bestätigt [181, 183-186].

Eine Hemmung des Kalzium-Influges, der mit einer Hemmung von PP-1 assoziiert ist, führt möglicherweise zu einer Hemmung der Insulinsekretion der Beta-Zelle.

Leptin hemmt somit die Insulinsekretion der Beta-Zelle u.a. durch eine Reduktion des Kalzium-Influges, der zum einen über eine Aktivierung von Kalium-Kanälen und zum anderen vermutlich durch eine Inhibition der PP-1 $\alpha$  Expression in INS-1 Beta-Zellen vermittelt wird (Abb. 26).



**Abbildung 26:** Darstellung der Leptin vermittelten Hemmung der Insulinsekretion über eine Regulation der Protein Phosphatase 1 und einen verminderten Ca<sup>2+</sup> Influx in die Beta-Zelle.

Die Bedeutung von PP-1α für die Funktion der Beta-Zelle wird unterstützt durch Untersuchungen an Tiermodellen für Diabetes mellitus Typ 2 wie z.B. Goto-Kakizaki Mäuse. Diese zeigen eine verminderte Aktivität von PP-1 [187, 188].

Darüber hinaus führt eine Mutation beim Menschen in der regulatorischen Untereinheit PPP1R zu der Entwicklung einer Insulinresistenz und der Ausbildung eines Diabetes mellitus Typ 2 [19, 29].

Bei Pima Indianern, die zu der Ausbildung eines Diabetes mellitus Typ 2 neigen, wurde eine verminderte PPP1R Aktivität gemessen [189-191].

Diese Beobachtungen zeigen die Bedeutung einer verminderten Aktivität von PP-1 für die Insulinsekretion.

Eine Hemmung durch Leptin oder Cal A führt zu einer Reduktion der Insulinsekretion. Dabei ist der genaue Mechanismus, durch den Leptin die Expression von PP-1α hemmt, noch unklar.

#### **4.6 Die adipoinsuläre Achse und Diabetes mellitus Typ 2**

Leptin hemmt im Hypothalamus die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch [39]. Abgesehen von dieser zentralen Wirkung, hemmt Leptin die Insulinsekretion der Beta-Zelle des endokrinen Pankreas. Diese Reduktion wird über eine Regulation verschiedener Gene und Proteine in der Beta-Zelle vermittelt [90, 94, 102].

Dabei wird die Insulinsekretion, abgesehen von der Genexpression, kurzfristig durch Glukose, Inkretin-Hormone oder andere Stimuli reguliert [192].

Langfristig allerdings reguliert Leptin die Insulinsekretion der Beta-Zelle und passt so den „set-point“ der Insulinsekretion an die Fettgewebsreserven an. Auf diese Weise entsteht ein Gleichgewicht zwischen dem Anteil des Fettgewebes und der Insulinsekretion der Beta-Zelle.

Dieser Regelkreis zwischen dem Fettgewebe und der Beta-Zelle des Pankreas wird als adipoinsuläre Achse bezeichnet [90, 193].

In übergewichtigen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 wurde die Hyperinsulinämie bisher als Zeichen einer Insulinresistenz erklärt [194, 195]. Dagegen wurde in Untersuchungen an Ratten häufig die Hyperinsulinämie vor dem Auftreten einer Insulinresistenz beobachtet [55, 87, 196-202].

Eine Fehlregulation der Insulinsekretion der Beta-Zelle und nicht primär eine Insulinresistenz wird aus diesem Grunde als Auslöser für die Hyperinsulinämie diskutiert.

In Tiermodellen für die Entwicklung von Adipositas sowie beim adipösen Menschen wurden, aufgrund der proportional zum Fettgewebe stimulierten Leptinsekretion, hohe Leptinserumspiegel gemessen.

Dies führt zu einer im Hypothalamus beschriebenen Ausbildung einer Leptinresistenz. Diese Verminderung der Leptinwirkung wird mit einer Änderung der Leptin vermittelten Signalkaskade in der Zelle erklärt [203].

Eine Leptinresistenz wird ebenfalls an der Beta-Zelle des endokrinen Pankreas postuliert [90, 204]. Eine Verminderung der Leptinsensitivität führt zu einer Dysregulation der adipoinsulären Achse zwischen dem Fettgewebe und der Beta-Zelle.

## Diskussion

Aufgrund der reduzierten hemmenden Leptinwirkung auf die Beta-Zelle, entsteht eine gesteigerte Insulinsekretion. Die erhöhten Insulinspiegel unterstützen die Entwicklung einer Insulinresistenz und fördern zusätzlich die Leptinsekretion. Auf diese Weise wird die Leptinresistenz weiter gesteigert. Es entsteht ein *circulus vitiosus*, der die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 in übergewichtigen Patienten durch eine Fehlregulation der adipoinsulären Achse bewirkt [90, 204].

In dieser Arbeit wurden die möglichen Kandidatengene Scg II und PP-1 $\alpha$  in der Beta-Zelle charakterisiert. Leptin hemmt die Genexpression von PP-1 $\alpha$  und Scg II in INS-1 Beta-Zellen. Eine Dysregulation dieser Gene in der Beta-Zelle führt möglicherweise zu der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2.

Darüber hinaus können diese Gene Ansatzpunkte für die Entwicklung von Medikamenten bei der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 sein.

## 5 Zusammenfassung

Leptin reguliert die Sättigungszentren in den Kerngebieten des Hypothalamus. Zusätzlich hemmt es die Insulinsekretion der Beta-Zelle des endokrinen Pankreas. Umgekehrt fördert Insulin die Leptinsekretion des Fettgewebes. Dieser Regelkreis wird als adipoinsuläre Achse beschrieben.

Fehlregulationen dieses Regelkreises werden bei übergewichtigen Patienten mit Leptinresistenz als Mechanismus bei der Ausbildung eines Diabetes mellitus Typ 2 diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Leptin auf die Beta-Zelle des endokrinen Pankreas untersucht. Ziel dieser Arbeit war die Identifikation neuer Leptin regulierter Gene. Dafür wurde unter anderem die Insulinom-Zelllinie INS-1 verwendet. In den vorliegenden Untersuchungen hemmte Leptin die mRNA-Expression von Insulin und dem Transkriptionsfaktor NeuroD1 in INS-1 Zellen.

Darüber hinaus hemmte Leptin die mRNA- und Proteinexpression von Secretogranin II (Scg II) in INS-1 Zellen. Scg II wurde mit immunzytochemischen Färbungen in den Vesikeln von INS-1 Zellen nachgewiesen.

Leptin hemmte des Weiteren die mRNA- und Proteinexpression sowie die Enzymaktivität der katalytischen Untereinheit der Protein Phosphatase 1  $\alpha$  (PP-1 $\alpha$ ) in INS-1 Zellen. In humanen Pankreasinseln wurde eine Kolo-kalisation von PP-1 $\alpha$  und Insulin nachgewiesen. Eine Hemmung von PP-1 $\alpha$  durch Calyculin A (Cal A) führte zu einer Reduktion der Insulinsekretion von INS-1 Zellen und humanen Pankreasinseln, sowie zu einer Reduktion des Kalzium-Influges in INS-1 Beta-Zellen.

Anhand dieser Ergebnisse könnte die hemmende Wirkung von Leptin auf die Insulinsekretion durch eine Regulation von PP-1 $\alpha$  erklärt werden. Dabei führt die Inhibition von PP-1 $\alpha$  zu einer Hemmung der Kalzium Kanäle, die wiederum eine Reduktion der Insulinsekretion bewirkt.

In dieser Arbeit wurden neue Leptin regulierte Gene in INS-1 Beta-Zellen identifiziert und charakterisiert. Diese Ergebnisse zeigen neue Einblicke in die Regulation der Insulinsekretion. Darüber hinaus ergeben sich für die Zukunft mögliche Ansatzpunkte bei der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2.

## 6 Literatur

1. *Geographical variation in the major risk factors of coronary heart disease in men and women aged 35-64 years. The WHO MONICA Project.* World Health Stat Q, 1988. 41(3-4): p. 115-40.
2. Kuczmarski, R.J., et al., *Increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991.* Jama, 1994. 272(3): p. 205-11.
3. Gruters, A., S. Wiegand, and H. Krude, [*Gene, fast food and no motion. Causes of childhood obesity*]. MMW Fortschr Med, 2002. 144(9): p. 34-6.
4. Friedman, J.M., *Obesity in the new millennium.* Nature, 2000. 404(6778): p. 632-4.
5. Willett, W.C., W.H. Dietz, and G.A. Colditz, *Guidelines for healthy weight.* N Engl J Med, 1999. 341(6): p. 427-34.
6. Willett, W.C., et al., *Weight, weight change, and coronary heart disease in women. Risk within the 'normal' weight range.* Jama, 1995. 273(6): p. 461-5.
7. Han, T.S., et al., *Waist circumference action levels in the identification of cardiovascular risk factors: prevalence study in a random sample.* Bmj, 1995. 311(7017): p. 1401-5.
8. Colditz, G.A., et al., *Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women.* Ann Intern Med, 1995. 122(7): p. 481-6.
9. Wolf, A.M. and G.A. Colditz, *Current estimates of the economic cost of obesity in the United States.* Obes Res, 1998. 6(2): p. 97-106.
10. Levy, E., et al., *The economic cost of obesity: the French situation.* Int J Obes Relat Metab Disord, 1995. 19(11): p. 788-92.
11. Seidell, J.C., *Societal and personal costs of obesity.* Exp Clin Endocrinol Diabetes, 1998. 106 Suppl 2: p. 7-9.
12. Lehtovirta, M., et al., *Insulin sensitivity and insulin secretion in monozygotic and dizygotic twins.* Diabetologia, 2000. 43(3): p. 285-93.
13. Poulsen, P., et al., *Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study.* Diabetologia, 1999. 42(2): p. 139-45.
14. Kolterman, O.G., et al., *Mechanisms of insulin resistance in human obesity: evidence for receptor and postreceptor defects.* J Clin Invest, 1980. 65(6): p. 1272-84.
15. Reynisdottir, S., et al., *Multiple lipolysis defects in the insulin resistance (metabolic) syndrome.* J Clin Invest, 1994. 93(6): p. 2590-9.
16. Kopelman, P.G., *Obesity as a medical problem.* Nature, 2000. 404(6778): p. 635-43.
17. Leong, K.S. and J.P. Wilding, *Obesity and diabetes.* Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 1999. 13(2): p. 221-37.
18. Hansen, L., *Candidate genes and late-onset type 2 diabetes mellitus. Susceptibility genes or common polymorphisms?* Dan Med Bull, 2003. 50(4): p. 320-46.
19. Hansen, L. and O. Pedersen, *Genetics of type 2 diabetes mellitus: status and perspectives.* Diabetes Obes Metab, 2005. 7(2): p. 122-35.
20. Hansen, T., *Type 2 diabetes mellitus--a multifactorial disease.* Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med], 2002. 57(1): p. 544-9.



21. Almind, K., A. Doria, and C.R. Kahn, *Putting the genes for type II diabetes on the map*. Nat Med, 2001. 7(3): p. 277-9.
22. Gordon-Larsen, P., L.S. Adair, and B.M. Popkin, *Ethnic differences in physical activity and inactivity patterns and overweight status*. Obes Res, 2002. 10(3): p. 141-9.
23. Hodge, A.M., et al., *Prevalence and secular trends in obesity in Pacific and Indian Ocean island populations*. Obes Res, 1995. 3 Suppl 2: p. 77s-87s.
24. Fajans, S.S., G.I. Bell, and K.S. Polonsky, *Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young*. N Engl J Med, 2001. 345(13): p. 971-80.
25. Harris, F., et al., *Role of calpains in diabetes mellitus: a mini review*. Mol Cell Biochem, 2004. 261(1-2): p. 161-7.
26. Horikawa, Y., et al., *Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus*. Nat Genet, 2000. 26(2): p. 163-75.
27. Savage, D.B., et al., *Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. Diabetes, 2003. 52(4): p. 910-7.
28. Hansen, L., et al., *Polymorphism in the glycogen-associated regulatory subunit of type 1 protein phosphatase (PPP1R3) gene and insulin sensitivity*. Diabetes, 2000. 49(2): p. 298-301.
29. Savage, D.B., et al., *Digenic inheritance of severe insulin resistance in a human pedigree*. Nat Genet, 2002. 31(4): p. 379-84.
30. Schwappach, B., et al., *Molecular basis for K(ATP) assembly: transmembrane interactions mediate association of a K<sup>+</sup> channel with an ABC transporter*. Neuron, 2000. 26(1): p. 155-67.
31. Koster, J.C., et al., *Targeted overactivity of beta cell K(ATP) channels induces profound neonatal diabetes*. Cell, 2000. 100(6): p. 645-54.
32. Barsh, G.S., I.S. Farooqi, and S. O'Rahilly, *Genetics of body-weight regulation*. Nature, 2000. 404(6778): p. 644-51.
33. Allison, D.B., et al., *The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1996. 20(6): p. 501-6.
34. Ohta, T., et al., *Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome*. Am J Hum Genet, 1999. 64(2): p. 397-413.
35. Kolehmainen, J., et al., *Refined mapping of the Cohen syndrome gene by linkage disequilibrium*. Eur J Hum Genet, 1997. 5(4): p. 206-13.
36. Russell-Eggitt, I.M., et al., *Alstrom syndrome. Report of 22 cases and literature review*. Ophthalmology, 1998. 105(7): p. 1274-80.
37. Beales, P.L., et al., *Bardet-Biedl syndrome: a molecular and phenotypic study of 18 families*. J Med Genet, 1997. 34(2): p. 92-8.
38. Mathews, K.D., et al., *Linkage localization of Borjeson-Forssman-Lehmann syndrome*. Am J Med Genet, 1989. 34(4): p. 470-4.
39. Schwartz, M.W., et al., *Central nervous system control of food intake*. Nature, 2000. 404(6778): p. 661-71.
40. Yeo, G.S., et al., *A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity*. Nat Genet, 1998. 20(2): p. 111-2.
41. Vaisse, C., et al., *A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity*. Nat Genet, 1998. 20(2): p. 113-4.
42. Yeo, G.S., et al., *A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay*. Nat Neurosci, 2004. 7(11): p. 1187-9.

43. Clement, K. and P. Ferre, *Genetics and the pathophysiology of obesity*. *Pediatr Res*, 2003. 53(5): p. 721-5.
44. Krude, H., et al., *Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans*. *Nat Genet*, 1998. 19(2): p. 155-7.
45. Krude, H., et al., *Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. 88(10): p. 4633-40.
46. Krude, H. and A. Gruters, *Implications of proopiomelanocortin (POMC) mutations in humans: the POMC deficiency syndrome*. *Trends Endocrinol Metab*, 2000. 11(1): p. 15-22.
47. Siracusa, L.D., *The agouti gene: turned on to yellow*. *Trends Genet*, 1994. 10(12): p. 423-8.
48. Michaud, E.J., et al., *Role of the agouti gene in obesity*. *J Endocrinol*, 1997. 155(2): p. 207-9.
49. Michaud, E.J., et al., *A molecular model for the genetic and phenotypic characteristics of the mouse lethal yellow (Ay) mutation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(7): p. 2562-6.
50. Huszar, D., et al., *Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice*. *Cell*, 1997. 88(1): p. 131-41.
51. Yaswen, L., et al., *Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin*. *Nat Med*, 1999. 5(9): p. 1066-70.
52. Noben-Trauth, K., et al., *A candidate gene for the mouse mutation tubby*. *Nature*, 1996. 380(6574): p. 534-8.
53. Naggert, J.K., et al., *Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity*. *Nat Genet*, 1995. 10(2): p. 135-42.
54. Coleman, D.L., *Diabetes-obesity syndromes in mice*. *Diabetes*, 1982. 31(Suppl 1 Pt 2): p. 1-6.
55. Coleman, D.L. and K.P. Hummel, *Hyperinsulinemia in pre-weaning diabetes (db) mice*. *Diabetologia*, 1974. 10 Suppl: p. 607-10.
56. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. *Nature*, 1994. 372(6505): p. 425-32.
57. Campfield, L.A., et al., *Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks*. *Science*, 1995. 269(5223): p. 546-9.
58. Halaas, J.L., et al., *Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene*. *Science*, 1995. 269(5223): p. 543-6.
59. Pelleymounter, M.A., et al., *Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice*. *Science*, 1995. 269(5223): p. 540-3.
60. Chicurel, M., *Whatever happened to leptin?* *Nature*, 2000. 404(6778): p. 538-40.
61. Bado, A., et al., *The stomach is a source of leptin*. *Nature*, 1998. 394(6695): p. 790-3.
62. Masuzaki, H., et al., *Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans*. *Nat Med*, 1997. 3(9): p. 1029-33.
63. Wang, J., et al., *A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat*. *Nature*, 1998. 393(6686): p. 684-8.
64. Esler, M., et al., *Leptin in human plasma is derived in part from the brain, and cleared by the kidneys*. *Lancet*, 1998. 351(9106): p. 879.

65. Li, H.Y., L.L. Wang, and R.S. Yeh, *Leptin immunoreactivity in the central nervous system in normal and diabetic rats*. Neuroreport, 1999. 10(2): p. 437-42.
66. Considine, R.V., et al., *Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans*. N Engl J Med, 1996. 334(5): p. 292-5.
67. Havel, P.J., et al., *Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. 81(12): p. 4406-13.
68. Maffei, M., et al., *Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects*. Nat Med, 1995. 1(11): p. 1155-61.
69. McGregor, G.P., et al., *Radiomunological measurement of leptin in plasma of obese and diabetic human subjects*. Endocrinology, 1996. 137(4): p. 1501-4.
70. Cummings, D.E. and M.W. Schwartz, *Melanocortins and body weight: a tale of two receptors*. Nat Genet, 2000. 26(1): p. 8-9.
71. Strobel, A., et al., *A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity*. Nat Genet, 1998. 18(3): p. 213-5.
72. Montague, C.T., et al., *Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans*. Nature, 1997. 387(6636): p. 903-8.
73. Clement, K., et al., *A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction*. Nature, 1998. 392(6674): p. 398-401.
74. Sierra-Honigmann, M.R., et al., *Biological action of leptin as an angiogenic factor*. Science, 1998. 281(5383): p. 1683-6.
75. Cioffi, J.A., et al., *Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction*. Nat Med, 1996. 2(5): p. 585-9.
76. Takeda, S., et al., *Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system*. Cell, 2002. 111(3): p. 305-17.
77. Waelput, W., et al., *A role for leptin in the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and in immune response*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2002. 1(3): p. 277-89.
78. Chehab, F.F., et al., *Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin*. Science, 1997. 275(5296): p. 88-90.
79. Welt, C.K., et al., *Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea*. N Engl J Med, 2004. 351(10): p. 987-97.
80. Cusin, I., et al., *The ob gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity*. Diabetes, 1995. 44(12): p. 1467-70.
81. Kolaczynski, J.W., et al., *Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro*. Diabetes, 1996. 45(5): p. 699-701.
82. D'Adamo, M., et al., *Increased OB gene expression leads to elevated plasma leptin concentrations in patients with chronic primary hyperinsulinemia*. Diabetes, 1998. 47(10): p. 1625-9.
83. Popovic, V., et al., *Serum leptin and insulin concentrations in patients with insulinoma before and after surgery*. Eur J Endocrinol, 1998. 138(1): p. 86-8.
84. Becker, D.J., et al., *Diet- and diabetes-induced changes of ob gene expression in rat adipose tissue*. FEBS Lett, 1995. 371(3): p. 324-8.
85. Havel, P.J., et al., *Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin*. Am J Physiol, 1998. 274(5 Pt 2): p. R1482-91.

86. MacDougald, O.A., et al., *Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(20): p. 9034-7.
87. Chen, N.G. and D.R. Romsos, *Enhanced sensitivity of pancreatic islets from preobese 2-week-old ob/ob mice to neurohormonal stimulation of insulin secretion*. Endocrinology, 1995. 136(2): p. 505-11.
88. Coleman, D.L., *Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice*. Diabetologia, 1978. 14(3): p. 141-8.
89. Seufert, J., T.J. Kieffer, and J.F. Habener, *Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(2): p. 674-9.
90. Kieffer, T.J. and J.F. Habener, *The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. 278(1): p. E1-E14.
91. Emilsson, V., et al., *Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion*. Diabetes, 1997. 46(2): p. 313-6.
92. Kieffer, T.J., et al., *Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta-cells*. Diabetes, 1997. 46(6): p. 1087-93.
93. Chen, N.G., A.G. Swick, and D.R. Romsos, *Leptin constrains acetylcholine-induced insulin secretion from pancreatic islets of ob/ob mice*. J Clin Invest, 1997. 100(5): p. 1174-9.
94. Seufert, J., et al., *Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. 84(2): p. 670-6.
95. Pallett, A.L., et al., *Leptin inhibits insulin secretion and reduces insulin mRNA levels in rat isolated pancreatic islets*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. 238(1): p. 267-70.
96. Lee, J.W. and D.R. Romsos, *Leptin administration normalizes insulin secretion from islets of Lep(ob)/Lep(ob) mice by food intake-dependent and -independent mechanisms*. Exp Biol Med (Maywood), 2003. 228(2): p. 183-7.
97. Widdup, G., et al., *In vivo and in vitro suppression by leptin of glucose-stimulated insulin hypersecretion in high glucose-fed rats*. Eur J Endocrinol, 2000. 143(3): p. 431-7.
98. Fehmann, H.C., et al., *Leptin inhibition of insulin secretion from isolated human islets*. Acta Diabetol, 1997. 34(4): p. 249-52.
99. Lupi, R., et al., *Effects of acute or prolonged exposure to human leptin on isolated human islet function*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. 256(3): p. 637-41.
100. Cases, J.A., et al., *Physiological increase in plasma leptin markedly inhibits insulin secretion in vivo*. Diabetes, 2001. 50(2): p. 348-52.
101. Kulkarni, R.N., et al., *Leptin rapidly suppresses insulin release from insulinoma cells, rat and human islets and, in vivo, in mice*. J Clin Invest, 1997. 100(11): p. 2729-36.
102. Seufert, J., *Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function*. Diabetes, 2004. 53 Suppl 1: p. S152-8.
103. Tartaglia, L.A., *The leptin receptor*. J Biol Chem, 1997. 272(10): p. 6093-6.
104. Lee, G.H., et al., *Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice*. Nature, 1996. 379(6566): p. 632-5.

105. Chen, H., et al., *Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice*. Cell, 1996. 84(3): p. 491-5.
106. Ghilardi, N. and R.C. Skoda, *The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line*. Mol Endocrinol, 1997. 11(4): p. 393-9.
107. Vaisse, C., et al., *Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice*. Nat Genet, 1996. 14(1): p. 95-7.
108. Rosenblum, C.I., et al., *Functional STAT 1 and 3 signaling by the leptin receptor (OB-R); reduced expression of the rat fatty leptin receptor in transfected cells*. Endocrinology, 1996. 137(11): p. 5178-81.
109. Morton, N.M., et al., *Leptin signalling in pancreatic islets and clonal insulin-secreting cells*. J Mol Endocrinol, 1999. 22(2): p. 173-84.
110. Bjorbaek, C., et al., *The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance*. J Biol Chem, 1999. 274(42): p. 30059-65.
111. Sweeney, G., *Leptin signalling*. Cell Signal, 2002. 14(8): p. 655-63.
112. Ashcroft, F.M. and P. Rorsman, *Electrophysiology of the pancreatic beta-cell*. Prog Biophys Mol Biol, 1989. 54(2): p. 87-143.
113. Harvey, J. and M.L. Ashford, *Insulin occludes leptin activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in rat CRI-G1 insulin secreting cells*. J Physiol, 1998. 511 ( Pt 3): p. 695-706.
114. Ashcroft, S.J., *The beta-cell K(ATP) channel*. J Membr Biol, 2000. 176(3): p. 187-206.
115. Holz, G.G. and J.F. Habener, *Signal transduction crosstalk in the endocrine system: pancreatic beta-cells and the glucose competence concept*. Trends Biochem Sci, 1992. 17(10): p. 388-93.
116. Zawalich, W.S., M. Bonnet-Eymard, and K.C. Zawalich, *Signal transduction in pancreatic beta-cells: regulation of insulin secretion by information flow in the phospholipase C/protein kinase C pathway*. Front Biosci, 1997. 2: p. d160-72.
117. Zhao, A.Z., K.E. Bornfeldt, and J.A. Beavo, *Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B*. J Clin Invest, 1998. 102(5): p. 869-73.
118. Harvey, J. and M.L. Ashford, *Role of tyrosine phosphorylation in leptin activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the rat insulinoma cell line CRI-G1*. J Physiol, 1998. 510 ( Pt 1): p. 47-61.
119. Harvey, J., et al., *Leptin activates ATP-sensitive potassium channels in the rat insulin-secreting cell line, CRI-G1*. J Physiol, 1997. 504 ( Pt 3): p. 527-35.
120. Tanabe, K., et al., *Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. 241(3): p. 765-8.
121. Sekine, N., et al., *Glucose-induced insulin secretion in INS-1 cells depends on factors present in fetal calf serum and rat islet-conditioned medium*. Diabetes, 1997. 46(9): p. 1424-33.
122. Asfari, M., et al., *Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines*. Endocrinology, 1992. 130(1): p. 167-78.
123. Morris, K.M., et al., *Complement biosynthesis by the human hepatoma-derived cell line HepG2*. J Clin Invest, 1982. 70(4): p. 906-13.
124. Mullis, K.B. and F.A. Faloua, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol, 1987. 155: p. 335-50.
125. Ragolia, L. and N. Begum, *The relationship between insulin signaling and protein phosphatase 1 activation*. Methods Mol Biol, 1998. 93: p. 157-67.

126. Syed, N.A. and R.L. Khandelwal, *Reciprocal regulation of glycogen phosphorylase and glycogen synthase by insulin involving phosphatidylinositol-3 kinase and protein phosphatase-1 in HepG2 cells*. Mol Cell Biochem, 2000. 211(1-2): p. 123-36.
127. Gryniewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien, *A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties*. J Biol Chem, 1985. 260(6): p. 3440-50.
128. Bandisod, M.S., *Effect of arginine and glucagon on perfused purified beta cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. 151(2): p. 948-53.
129. Seufert, J., G.C. Weir, and J.F. Habener, *Differential expression of the insulin gene transcriptional repressor CCAAT/enhancer-binding protein beta and transactivator islet duodenum homeobox-1 in rat pancreatic beta cells during the development of diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1998. 101(11): p. 2528-39.
130. Yamaoka, T. and M. Itakura, *Development of pancreatic islets (review)*. Int J Mol Med, 1999. 3(3): p. 247-61.
131. Kemp, D.M., J.C. Lin, and J.F. Habener, *Regulation of Pax4 paired homeodomain gene by neuron-restrictive silencer factor*. J Biol Chem, 2003. 278(37): p. 35057-62.
132. Qiu, Y., et al., *Insulin gene transcription is mediated by interactions between the p300 coactivator and PDX-1, BETA2, and E47*. Mol Cell Biol, 2002. 22(2): p. 412-20.
133. Brink, C., *Promoter elements in endocrine pancreas development and hormone regulation*. Cell Mol Life Sci, 2003. 60(6): p. 1033-48.
134. Malecki, M.T., et al., *Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus*. Nat Genet, 1999. 23(3): p. 323-8.
135. Habener, J.F. and D.A. Stoffers, *A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus*. Proc Assoc Am Physicians, 1998. 110(1): p. 12-21.
136. Liu, M., et al., *GPR56, a novel secretin-like human G-protein-coupled receptor gene*. Genomics, 1999. 55(3): p. 296-305.
137. Schenk, P.W., et al., *A serpentine receptor-dependent, Gbeta- and Ca(2+) influx-independent pathway regulates mitogen-activated protein kinase ERK2 in Dictyostelium*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. 260(2): p. 504-9.
138. Shashidhar, S., et al., *GPR56 is a GPCR that is overexpressed in gliomas and functions in tumor cell adhesion*. Oncogene, 2005.
139. Piao, X., et al., *G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex*. Science, 2004. 303(5666): p. 2033-6.
140. Rosa, P. and A. Zanini, *Characterization of adenohipophysial polypeptides by two-dimensional gel electrophoresis. II. Sulfated and glycosylated polypeptides*. Mol Cell Endocrinol, 1981. 24(2): p. 181-93.
141. Fischer-Colbrie, R., A. Laslop, and R. Kirchmair, *Secretogranin II: molecular properties, regulation of biosynthesis and processing to the neuropeptide secretoneurin*. Prog Neurobiol, 1995. 46(1): p. 49-70.
142. Taupenot, L., K.L. Harper, and D.T. O'Connor, *The chromogranin-secretogranin family*. N Engl J Med, 2003. 348(12): p. 1134-49.
143. Tilemans, D., et al., *Isolation of two peptides from rat gonadotroph-conditioned medium displaying an amino acid sequence identical to fragments of secretogranin II*. Peptides, 1994. 15(3): p. 537-45.
144. Soszynski, D., et al., *Secretogranin II: regulation of synthesis and post-translational proteolysis in bovine adrenal chromaffin cells*. J Neuroendocrinol, 1993. 5(6): p. 655-62.

145. Kirchmair, R., et al., *Secretoneurin--a neuropeptide generated in brain, adrenal medulla and other endocrine tissues by proteolytic processing of secretogranin II (chromogranin C)*. Neuroscience, 1993. 53(2): p. 359-65.
146. Thompson, M.E., et al., *Prolactin granulogenesis is associated with increased secretogranin expression and aggregation in the Golgi apparatus of GH4C1 cells*. Endocrinology, 1992. 131(1): p. 318-26.
147. Anouar, Y., et al., *Estradiol negatively regulates secretogranin II and chromogranin A messenger ribonucleic acid levels in the female rat pituitary but not in the adrenal*. Endocrinology, 1991. 129(5): p. 2393-9.
148. Anouar, Y. and J. Duval, *Differential expression of secretogranin II and chromogranin A genes in the female rat pituitary through sexual maturation and estrous cycle*. Endocrinology, 1991. 128(3): p. 1374-80.
149. Kakar, S.S., et al., *Regulation of expression of secretogranin II mRNA in female rat pituitary and hypothalamus*. Neuroendocrinology, 1993. 57(3): p. 422-31.
150. Bauer, J.W., et al., *Histamine induces a gene-specific synthesis regulation of secretogranin II but not of chromogranin A and B in chromaffin cells in a calcium-dependent manner*. J Biol Chem, 1993. 268(3): p. 1586-9.
151. Schimmel, A., et al., *The organisation of the mouse secretogranin II gene*. FEBS Lett, 1992. 314(3): p. 375-80.
152. Scammell, J.G., et al., *Regulation of secretogranin II mRNA in rat neuronal cultures*. Brain Res Mol Brain Res, 1995. 33(2): p. 326-32.
153. Horsthemke, B., et al., *Somatic mosaicism for maternal uniparental disomy 15 in a girl with Prader-Willi syndrome: confirmation by cell cloning and identification of candidate downstream genes*. Hum Mol Genet, 2003. 12(20): p. 2723-32.
154. Delghingaro-Augusto, V., et al., *A low protein diet alters gene expression in rat pancreatic islets*. J Nutr, 2004. 134(2): p. 321-7.
155. Ceulemans, H. and M. Bollen, *Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button*. Physiol Rev, 2004. 84(1): p. 1-39.
156. Ceulemans, H., W. Stalmans, and M. Bollen, *Regulator-driven functional diversification of protein phosphatase-1 in eukaryotic evolution*. Bioessays, 2002. 24(4): p. 371-81.
157. Wera, S. and B.A. Hemmings, *Serine/threonine protein phosphatases*. Biochem J, 1995. 311 ( Pt 1): p. 17-29.
158. Cohen, P., *The structure and regulation of protein phosphatases*. Annu Rev Biochem, 1989. 58: p. 453-508.
159. Okano, K., et al., *Genomic organization and functional analysis of the murine protein phosphatase 1c gamma (Ppp1cc) gene*. Genomics, 1997. 45(1): p. 211-5.
160. Goldberg, J., et al., *Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1*. Nature, 1995. 376(6543): p. 745-53.
161. Cohen, P.T., *Protein phosphatase 1--targeted in many directions*. J Cell Sci, 2002. 115(Pt 2): p. 241-56.
162. Egloff, M.P., et al., *Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate*. J Mol Biol, 1995. 254(5): p. 942-59.
163. Brady, M.J. and A.R. Saltiel, *The role of protein phosphatase-1 in insulin action*. Recent Prog Horm Res, 2001. 56: p. 157-73.

164. Begum, N., J.M. Olefsky, and B. Draznin, *Mechanism of impaired metabolic signaling by a truncated human insulin receptor. Decreased activation of protein phosphatase 1 by insulin.* J Biol Chem, 1993. 268(11): p. 7917-22.
165. Munro, S., et al., *Human skeletal muscle expresses a glycogen-targeting subunit of PP1 that is identical to the insulin-sensitive glycogen-targeting subunit G(L) of liver.* Diabetes, 2002. 51(3): p. 591-8.
166. Herzig, S. and J. Neumann, *Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes.* Physiol Rev, 2000. 80(1): p. 173-210.
167. Bollen, M. and W. Stalmans, *The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases.* Crit Rev Biochem Mol Biol, 1992. 27(3): p. 227-81.
168. Barker, H.M., et al., *Localization of the gene encoding a type I protein phosphatase catalytic subunit to human chromosome band 11q13.* Genomics, 1990. 7(2): p. 159-66.
169. Shima, H., et al., *Identification of PP1 catalytic subunit isotypes PP1 gamma 1, PP1 delta and PP1 alpha in various rat tissues.* Biochem Biophys Res Commun, 1993. 192(3): p. 1289-96.
170. da Cruz e Silva, E.F., et al., *Differential expression of protein phosphatase 1 isoforms in mammalian brain.* J Neurosci, 1995. 15(5 Pt 1): p. 3375-89.
171. Kita, A., et al., *Crystal structure of the complex between calyculin A and the catalytic subunit of protein phosphatase 1.* Structure (Camb), 2002. 10(5): p. 715-24.
172. Cohen, P., C.F. Holmes, and Y. Tsukitani, *Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation.* Trends Biochem Sci, 1990. 15(3): p. 98-102.
173. Fernandez, J.J., et al., *Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes.* Curr Med Chem, 2002. 9(2): p. 229-62.
174. Ishihara, H., et al., *Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity.* Biochem Biophys Res Commun, 1989. 159(3): p. 871-7.
175. Mitsuhashi, S., et al., *Tautomycetin is a novel and specific inhibitor of serine/threonine protein phosphatase type 1, PP1.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. 287(2): p. 328-31.
176. Sjöholm, A., et al., *Glucose metabolites inhibit protein phosphatases and directly promote insulin exocytosis in pancreatic beta-cells.* Endocrinology, 2002. 143(12): p. 4592-8.
177. Ammala, C., et al., *Activation of protein kinases and inhibition of protein phosphatases play a central role in the regulation of exocytosis in mouse pancreatic beta cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(10): p. 4343-7.
178. Liu, Y.J. and E. Gylfe, *Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in insulin-releasing pancreatic beta-cells.* Cell Calcium, 1997. 22(4): p. 277-86.
179. Haby, C., et al., *Inhibition of serine/threonine protein phosphatases promotes opening of voltage-activated L-type Ca<sup>2+</sup> channels in insulin-secreting cells.* Biochem J, 1994. 298 ( Pt 2): p. 341-6.
180. Hisatomi, M., H. Hidaka, and I. Niki, *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin and cyclic 3,5' adenosine monophosphate control movement of secretory granules through protein phosphorylation/dephosphorylation in the pancreatic beta-cell.* Endocrinology, 1996. 137(11): p. 4644-9.
181. Tamagawa, T., et al., *Effects of the protein phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A on insulin release from rat pancreatic islets.* Endocrinol Jpn, 1992. 39(3): p. 325-9.



182. Ammon, H.P., et al., *The phosphatase inhibitor okadaic acid blocks KCl-depolarization-induced rise of cytosolic calcium of rat insulinoma cells (RINm5F)*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1996. 354(2): p. 95-101.
183. Ratcliff, H. and P.M. Jones, *Effects of okadaic acid on insulin secretion from rat islets of Langerhans*. Biochim Biophys Acta, 1993. 1175(2): p. 188-91.
184. Sato, Y., et al., *Okadaic acid-induced decrease in the magnitude and efficacy of the Ca<sup>2+</sup> signal in pancreatic beta cells and inhibition of insulin secretion*. Br J Pharmacol, 1998. 123(1): p. 97-105.
185. Lilja, L., et al., *DARPP-32 and inhibitor-1 are expressed in pancreatic beta-cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. 329(2): p. 673-7.
186. Condrescu, M., et al., *Mode-specific inhibition of sodium-calcium exchange during protein phosphatase blockade*. J Biol Chem, 1999. 274(47): p. 33279-86.
187. Begum, N. and L. Ragolia, *Altered regulation of insulin signaling components in adipocytes of insulin-resistant type II diabetic Goto-Kakizaki rats*. Metabolism, 1998. 47(1): p. 54-62.
188. Metallo, A. and E. Villa-Moruzzi, *Protein phosphatase-1 and -2A, kinase FA, and casein kinase II in skeletal muscle of streptozotocin diabetic rats*. Arch Biochem Biophys, 1991. 289(2): p. 382-6.
189. Prochazka, M., et al., *Molecular and linkage analysis of type-1 protein phosphatase catalytic beta-subunit gene: lack of evidence for its major role in insulin resistance in Pima Indians*. Diabetologia, 1995. 38(4): p. 461-6.
190. Permana, P.A. and D.M. Mott, *Genetic analysis of human type 1 protein phosphatase inhibitor 2 in insulin-resistant Pima Indians*. Genomics, 1997. 41(1): p. 110-4.
191. Xia, J., C. Bogardus, and M. Prochazka, *A type 2 diabetes-associated polymorphic ARE motif affecting expression of PPP1R3 is involved in RNA-protein interactions*. Mol Genet Metab, 1999. 68(1): p. 48-55.
192. Holst, J.J. and J. Gromada, *Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. 287(2): p. E199-206.
193. Vickers, M.H., et al., *Dysregulation of the adipoinsular axis -- a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming*. J Endocrinol, 2001. 170(2): p. 323-32.
194. DeFronzo, R.A., *Pathogenesis of type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: a balanced overview*. Diabetologia, 1992. 35(4): p. 389-97.
195. Cerasi, E., *Insulin deficiency and insulin resistance in the pathogenesis of NIDDM: is a divorce possible?* Diabetologia, 1995. 38(8): p. 992-7.
196. Chick, W.L., R.L. Lavine, and A.A. Like, *Studies in the diabetic mutant mouse. V. Glucose tolerance in mice homozygous and heterozygous for the diabetes (db) gene*. Diabetologia, 1970. 6(3): p. 257-62.
197. Dubuc, P.U., *The development of obesity, hyperinsulinemia, and hyperglycemia in ob/ob mice*. Metabolism, 1976. 25(12): p. 1567-74.
198. Flatt, P.R., et al., *Age effects on glycosylated blood proteins in lean and obese hyperglycaemic (ob/ob) mice*. Diabetes Res, 1986. 3(5): p. 241-3.
199. Genuth, S.M., *Hyperinsulinism in mice with genetically determined obesity*. Endocrinology, 1969. 84(2): p. 386-91.
200. Genuth, S.M., R.J. Przybylski, and D.M. Rosenberg, *Insulin resistance in genetically obese, hyperglycemic mice*. Endocrinology, 1971. 88(5): p. 1230-8.

## Literaturangaben

201. Grundleger, M.L., V.Y. Godbole, and S.W. Thenen, *Age-dependent development of insulin resistance of soleus muscle in genetically obese (ob/ob) mice*. Am J Physiol, 1980. 239(5): p. E363-71.
202. Lin, P.Y., D.R. Romsos, and G.A. Leveille, *Food intake, body weight gain, and body composition of the young obese (ob/ob) mouse*. J Nutr, 1977. 107(9): p. 1715-23.
203. Bjorbaek, C., et al., *Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance*. Mol Cell, 1998. 1(4): p. 619-25.
204. Seufert, J., *[The significance of leptin for the pathogenesis of diabetes mellitus type 2. Direct effects on endocrine pancreas]*. Internist (Berl), 1999. 40(8): p. 894-7.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
Ak	Antikörper
AKAIs	A-Kinase-activated inhibitors
AKAP	A-Kinase-anchoring protein
APS	Ammoniumpersulfat
ASPP	Apoptosis stimulating protein of p53
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Maß Index
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Kohlenstoff
C	Celsius
C	Cytosin
Cal A	Calyculin A
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ci	Curie
Cl	Chlorid
cpm	Zerfälle pro Minute (counts per minute)
Da	Dalton
DARPP-32	Dopamine and cAMP-regulated protein of 32 kDa
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
GADDs	Growth arrest and DNA damage inducible proteins

## Abkürzungsverzeichnis

Gip	Glc7 interacting protein
GLP-1	Glukagon-like-Peptide 1
GnRH	Gonadotropin releasing hormon
GPR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
Grp78	Glucose-regulated protein of 78 kDa
h	Stunde
HEPES	n-2-Hydroxyethylpiperazin-N-Ethansulfonsäure
Hox 11	Homebox 11
IFN	Interferon
IL	Interleukin
JAK	Janus Kinase
K	Kalium
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Klp38B	Kinesin-like protein at 38B
konz.	Konzentriert
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen activated protein kinase
Mg	Magnesium
min	Minuten
mM	Millimolar
Mypts	Myosin phosphatase targeting subunit
N-CoR	Nuclear receptor corepressor
Nek 2	NIMA-related protein kinase 2
ng	Nanogramm
NKCC 1	Na-K-Cl-Kotransporter 1
NIPP 1	Nuclear inhibitor of PP-1
nM	Nanomolar
Pan1	Poly(A) ribonuclease 1
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDE-3B	Phosphodiesterase 3B

## Abkürzungsverzeichnis

Pg	Pikogramm
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -konzentration
PI-3-K	Phosphoinositide-3-Kinase
PHI	Phosphatase holoenzyme inhibitor
PK	Proteinkinase
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
pmol	Pikomol
PP-1	Protein Phosphatase 1
PRIP 1	Phospholipase C related inactive protein 1
PNUTS	Phosphatase 1 nuclear targeting subunit
RIPP 1	Ribosomal inhibitor of PP-1
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Kettenreaktion
s	Sekunden
SARA	Smad anchor for receptor activation
Scd 5	Suppressor of clathrin heavy-chain deficiency 5
Scg II	Secretogranin II
SD	Standartabweichung
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Sds 22	Suppressor of dis 2 mutant
SH 2	Src homology region 2 domain
Sla 1	Synthetically lethal with ABP1
SNF 5	Sucrose nonfermenting 5
SBP70	SH <sub>3</sub> domain binding protein of 70 kDa
SOCS	Suppressor of cytokine signalling
STAT	Signal transducer and activator of transcription
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Trisboratsäure-EDTA

## Abkürzungsverzeichnis

TIMAP	TGF- $\beta$ -inhibited membrane-associated protein
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volumen
V	Volt
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ M	Mikromol
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem

## **Danksagung**

Mein aufrichtiger und herzlicher Dank gilt PD Dr. Jochen Seufert für seine fachliche Unterstützung, für hilfreiche Diskussionen, seine intensive Betreuung im Rahmen der Doktorarbeit und die Perspektiven, die er ermöglicht hat.

Des Weiteren danke ich Prof. Franz Jakob für die Unterstützung dieser Doktorarbeit.

Darüber hinaus möchte ich Frau Sandra Royer und Frau Jeanette Roller für ihre technische Unterstützung danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Gerd und Hanne Kühnen, sowie meiner Tante Maria van Aerssen für ihre uneingeschränkte Unterstützung aller Aktivitäten.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Peter Kühnen  
Geburtstag 05. April 1977  
Geburtsort München

## Schulbildung

1983 – 1987 Hubertus Grundschule Kevelaer  
1987 – 1996 Kardinal von Galen Gymnasium Kevelaer  
1996 Abitur

## Zivildienst

07/96 – 07/97 Zivildienstleistender im Marienhospital Kevelaer

## Studium

10/97 – 09/04 Studium der Humanmedizin,  
Julius Maximilians Universität Würzburg  
09/99 Ärztliche Vorprüfung  
09/00 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04/03 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
06/04 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## Praktisches Jahr

04/03 Innere Medizin (Universitätsspital Zürich)  
08/03 Chirurgie (Universitätsklinik Würzburg)  
10/03 Pädiatrie (Campus Charité Virchow Klinikum,  
Universitätsmedizin Berlin)

## Berufliche Tätigkeit

seit 07/04 Assistenzarzt  
Campus Charité Virchow-Klinikum, Universitätsmedizin Berlin