# Neue zelluläre und molekulare Aspekte der Betazelldysfunktion beim Typ-2-Diabetes mellitus

# Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

## **Ramona Puff**

aus Schneckenlohe

München, 2010

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2006 bis Juli 2010 unter der Leitung von Dr. Andreas Lechner und Prof. Dr. Burkhard Göke (Medizinische Klinik II, Klinikum der LMU) an der Medizinischen Klinik II des Klinikums der Ludwig-Maximillians-Universität München/Großhadern angefertigt und von Seiten der biologischen Fakultät der LMU von Prof. Dr. Angelika Böttger (Zellbiologie, LMU) betreut.

Erstgutachter: Prof. Dr. Angelika Böttger Zweitgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Dissertation eingereicht am: 22. Juli 2010 Tag der mündlichen Prüfung: 24. September 2010

Inhalts	sverzeic	hnisI		
Abkür	zungsve	erzeichnis IX		
Zusan	nmenfas	ssungXIII		
1.	Einleit	ung1		
1.1	Insulin	und die Physiologie der Glukosehomöostase1		
	1.1.1 1.1.2 1.1.3	Insulinbiosynthese		
1.2	Diabete	es mellitus5		
	1.2.1 1.2.2 1.2.3 1.2.4	Definition, Prävalenz und Sekundärkomplikationen		
1.3	Rolle der $\beta$ -Zelle in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus			
1.4	Veränderungen pankreatischer β-Zellen während der Schwangerschaft15			
1.5	Osteop	rotegerin16		
1.6	Die Far	nilie der SOCS-Proteine		
	1.6.1 1.6.2	Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg		
1.7	Wissenschaftliche Fragestellung22			
2.	Material und Methoden24			
2.1	Materia	llien24		
	2.1.1	Geräte		
	2.1.2	Chemikalien und Reagenzien25		
	2.1.3	Verbrauchsmaterialien27		
	2.1.4	Kits		
	2.1.5	Puffer und Lösungen		

	2.1.6	Marker		33
	2.1.7	Oligonuk	leotide	33
		2.1.7.1	Primer	33
		2.1.7.2	siRNA	37
	2.1.8	Vektoren		38
	2.1.9	Antikorpe	97	39
		2.1.9.1	Primäre Antikörper	39
		2.1.9.2	Sekundäre Antikörper	40
	2.1.10	Enzyme.		41
	2.1.11	Zytokine		41
	2.1.12	Medien u	nd Medienzusätze	42
	2.1.13	Bakterier	nstämme	42
	2.1.14	Eukaryot	ische Zelllinien	43
	2.1.15	Mausstär	nme	43
2.2	Moloku	larhiologi	saha Mathadan	4.4
2.2	MOIERU	llarbiologi		44
	2.2.1	Klonierur	ng	44
		2.2.1.1	DNA-Amplifizierung mittels PCR	44
		2.2.1.2	Spezifische enzymatische Hydrolyse von DNA	45
		2.2.1.3	DNA-Gelektrophorese	46
		2.2.1.4	Reinigung von DNA und DNA-Extraktion aus Agarosegelen .	46
		2.2.1.5	Dephosphorylierung linearisierter DNA	47
		2.2.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten	47
		2.2.1.7	Transformation von Plasmid-DNA in E. coli	47
		2.2.1.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	47
		2.2.1.9	Kolonie-PCR	48
		2.2.1.10	DNA-Konzentrationsbestimmung	48
		2.2.1.11	Sequenzierung von DNA	49
		2.2.1.12	DNA-Mutagenese	49
		2.2.1.13	Anlegen von Glycerin-Dauerkulturen	49
		2.2.1.14	Konstruktion von Vektoren	49
	2.2.2	Semi-qua	antitative RT-PCR	53
		2.2.2.1	Isolation und Quantifizierung von Gesamt-RNA	53
		2.2.2.2	Reverse Transkription	54

		2.2.2.3	Semi-quantitative RT-PCR	54	
2.3	Zellbio	logische I	Methoden	54	
	2.3.1	Kultivieru	ing prokaryontischer Zellen	54	
	2.3.2	Kultivieru	ing eukaryontischer Zellen	55	
		2.3.2.1	Kryokonservierung und Auftauen	55	
		2.3.2.2	Kultivierung und Passagierung	56	
		2.3.2.3	Bestimmung der Zellzahl	56	
	2.3.3	Transfek	tionen eukaryontischer Zellen	57	
		2.3.3.1	Transiente und stabile Plasmidtransfektion	57	
		2.3.3.2	siRNA-Transfektion	59	
	2.3.4	Isolation	und Kultivierung muriner Langerhans scher Inseln	60	
	2.3.5	Insulinse	kretionsassay	61	
	2.3.6	In vitro-S	timulationen von Tumorzellen und Pankreasinseln	62	
	2.3.7	Bestimm	ung der prozentualen Ins-1E-Proliferation	63	
	2.3.8	MTT-Tes	st	64	
	2.3.9	Milzzelld	ifferenzierungsassay und TRAP-Färbung	65	
2.4	Proteir	Proteinchemische und immunologische Methoden			
	2.4.1	Proteinko	onzentrationsbestimmung	67	
	2.4.2	Western	·Blot	67	
		2.4.2.1	Herstellung von Proteinlysat	67	
		2.4.2.2	Elektrophorese in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen	68	
		2.4.2.3	Tank-Blot	69	
		2.4.2.4	Immunologische Detektion	70	
		2.4.2.5	Strippen von PVDF-Membranen	70	
	2.4.3	ELISA		71	
	2.4.4	Konzentr	ierung von OPG in Zellkulturüberständen	71	
	2.4.5	Immunflu	uoreszenz/Immunhistochemie	72	
		2.4.5.1	Hoechst/Propidiumiodidfärbung	72	
		2.4.5.2	BrdU/DAPI-Immunfluoreszenzfärbung adhärenter Zellen	72	
		2.4.5.3	Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten	73	
		2.4.5.4	Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten	74	

		2.4.5.5	TUNEL-Färbung	75	
2.5	Tiermo	dell		75	
	2.5.1	Gewichts	sbestimmung	75	
	2.5.2	Blutzucke	erbestimmung und Isolation von Blutplasma	75	
	2.5.3	Glukoset	oleranztests	76	
	2.5.4	Insulintol	eranztest	77	
	2.5.5	"Multiple-	low-dose-Streptozotocin"-Behandlung	77	
	2.5.6	Präparati	ion von Pankreasgewebe	77	
	2.5.7	Bestimm	ung von $\beta$ - und $\alpha$ -Zellmasse muriner Pankreata	78	
	2.5.8	Bestimm	ung der <i>in vivo</i> -Proliferation pankreatischer $\beta$ -Zellen	79	
	2.5.9	Bestimm	ung des relativen HOMA-IR-Index	80	
2.6	Compu	iteranalys	e/Statistik	80	
3.	Ergeb	nisse		81	
3.1	Das db/db-Mausmodell: Zelluläre Aspekte der β-Zelldysfunktion in der				
	Pathog	jenese de	es Typ-2-Diabetes mellitus	81	
	3.1.1	Adiposita	asentwicklung bei db/db-Mäusen	82	
	3.1.2	Vergleich	n der Nüchternblutzuckerspiegel von db/db-Mäusen mit		
		C57BL/6	J- und C57BLKS/J-Hintergrund	83	
	3.1.3	Vergleich	n der basalen Plasmainsulinspiegel von db/db-Mäusen		
		mit C57B	L/6J- und C57BLKS/J-Hintergrund	84	
	3.1.4	Relative	Insulinresistenz (HOMA-IR) von db/db-Mäusen	85	
	3.1.5	Analyse	der Inselmorphologie von db/db-Mäusen mit C57BL/6J-		
		und C57	BLKS/J-Hintergrund: Bestimmung der $\beta$ - und $\alpha$ -Zellmasse	86	
	3.1.6	In vivo-B	estimmung von $\beta$ -Zellproliferation und Apoptose endokriner		
		Zellen vo	n db/db-Mäusen mit C57BL/6J- und C57BLKS/J-Hintergrund	d91	
3.2	Moleku	lare Aspe	ekte der β-Zelldysfunktion in der Pathogenese des Typ-	2-	
	Diabet	es mellitu	S	95	
	3.2.1	Screenin	g geeigneter Kandidatengene	95	
		3.2.1.1	Expressionsprofil von Pankreasinseln nicht-trächtiger		
			und trächtiger C57BL/6-Mäuse	95	

	3.2.1.2	Express	sionsnachweis der Kandidatenproteine ZNRF2, RIK,	
		COMM	D7, ENY2, TCF25, SOCS2 und OPG in Ins-1E,	
		MIN6 u	nd C57BL/6-Mausinseln	96
3.2.2	Konstruk	tion geei	gneter Überexpressionsvektoren	98
3.2.3	<i>In vitro</i> -P	roliferatio	onsanalyse von COMMD7, RIK, ENY2, TCF25,	
	SOCS2 L	and OPG	in verschiedenen Tumorzelllinien	99
3.2.4	Analyse o	der physi	ologischen Funktion von Osteoprotegerin in den	
	pankreati	ischen β-	Zellen	102
	3.2.4.1	Endoge	ene Expression von OPG in trächtigen	
		C57BL/	6-Mäusen	102
	3.2.4.2	Nachwe	eis der Überexpression von OPG und Test einer	
		OPG-S	uppression durch RNA-Interferenz in Ins-1E-Zellen	105
	3.2.4.3	Nachwe	eis der biologischen Aktivität exogener OPG-	
		Proteine	e sowie der rekombinanten OPG-Rezeptoren	
		RANKL	und TRAIL	108
	3.2.4.4	In vitro-	Analyse des Effektes von OPG auf die glukose-	
		stimulie	rte Insulinsekretion von Ins-1E- und MIN6-Zellen	
		sowie v	on C57BL/6-Pankreasinseln	111
	3.2.4.5	In-vitro-	Analyse des Effektes von OPG auf die Apoptose	
		von β-Z	ellen	112
	3.2.4.6	Einfluss	s von OPG auf die Aktivierung der MAP-Kinasen	
		JNK1/2	, p44/42-MAPK und p38-MAPK nach IL-1β-	
		Stimula	tion <i>in vitro</i>	119
3.2.5	Analyse o	der physi	ologischen Funktion von SOCS2 in den	
	pankreati	ischen β-	Zellen	122
	3.2.5.1	Endoge	ene Expression von SOCS2 in trächtigen	
		C57BL/	6-Mäusen	122
	3.2.5.2	Nachwe	eis der Überexpression von SOCS2 sowie einer	
		effektive	en SOCS2-Suppression durch RNA-Interferenz	
		in Ins-1	E-Zellen	123
	3.2.5.3	Analyse	e des Effektes von SOCS2 auf die Proliferation	
		von β-Z	Zellen	126
	3.	2.5.3.1	In vitro-Untersuchung der physiologischen	
			Funktion von SOCS2 im Rahmen der GH-	
			stimulierten β-Zellproliferation	126

		3.2.5.3.2	Analyse der Kompensierung potentieller	
			SOCS2-Effekte	131
		3.2.5.3.3	Bestimmung der β-Zellmasse in SOCS2-	
			Knockout-Mäusen	133
		3.2.5.4 Analyse	e des Effektes von SOCS2 auf die	
		β-Zellap	poptose	134
		3.2.5.4.1	In vitro-Analyse des Einflusses von SOCS2 auf	
			die Apoptose von β-Zellen	134
		3.2.5.4.2	Einfluss von SOCS2 auf die Aktivierung der MAP-	
			Kinasen JNK1/2, p44/42-MAPK und p38-MAPK	
			nach IL-1β-Stimulation <i>in vitro</i>	138
		3.2.5.4.3	In vivo-Untersuchung des Einflusses von SOCS2	
			auf die autoimmunvermittelte Zerstörung	
			pankreatischer β-Zellen	140
		3255 Untorsu	ichung das Einflussas van SOCS2 auf dia	
		B-Zellfu	nktion	142
		3.2.5.5.1	In vitro-Analyse der physiologischen Funktion	
			von SOCS2 auf die glukosestimulierte insulin-	
			sekretion von Ins-1E-Zellen sowie von C57BL/6- und	4 4 0
		00550		142
		3.2.5.5.2	In VIVo-Untersuchung der Glukosetoleranz von	
		00550	SUCS2-Knockout-Mausen	144
		3.2.5.5.3	In VIVO-Untersuchung der Insulintoleranz von	4 4 <del>7</del>
			SOCS2-Knockout-Mausen	147
4.	Diskus	ssion		149
1 1	تماليالم	a Aanakta dar R	Zelldvefunktion in der Dethegenege des Tup 2	
4.1		e Aspekie der p-	zelidysfurktion in der Pathogenese des Typ-z-	
	Diabete	es mellitus		149
	4.1.1	Genetische Deter	mination der Diabetessuszeptibilität beim	
		Tiermodell der db	/db-Maus	150
	4.1.2	Diabetessuszeptik	pilität von db/db BKS-Mäusen begründet auf	
		einer inadäquater	Anpassung der β-Zellmasse	151
		4.1.2.1 Phänoty	pische Unterschiede zwischen db/db B6- und	
		db/db B	KS-Mäusen trotz vergleichbarer Insulinresistenz	151

		4.1.2.2	Diabetessuszeptibilität von db/db BKS-Mäusen basiert			
			auf einem altersbedingten Kompensierungsdefizit			
			der β-Zellmasse	152		
	4.1.3	Einfluss	der pankreatischen α-Zellen auf die Diabetessuszeptibilität			
		von db/d	b-Mäusen	156		
	4.1.4	Ausblick		157		
4.2.	Moleku	lare Aspe	ekte der β-Zelldysfunktion in der Pathogenese des Typ-2	2-		
	Diabete	es mellitu	s	158		
	4.2.1	Identifizie	erung neuer Kandidatengene mit potentieller			
		Regulato	rfunktion in den pankreatischen β-Zellen	158		
	4.2.2	Molekula	re Analyse der physiologischen Bedeutung von			
		Osteopro	otegerin in den pankreatischen β-Zellen	160		
		4.2.2.1	Potentielle Funktion von OPG als positiver Regulator			
			der β-Zellmasse	160		
		4.2.2.2	Protektiver Effekt von OPG gegenüber einer IL-1β-			
			induzierten β-Zellapoptose geschieht über einen			
			RANKL/TRAIL-unabhängigen Mechanismus			
		4.2.2.3	Protektiver Effekt von OPG gegenüber einer IL-1β-			
			induzierten β-Zellapoptose involviert Änderungen im			
			MAP-Kinase-Signaling	164		
		4.2.2.4	Klinische Bedeutung von OPG in der Prävention und			
			Behandlung des Diabetes mellitus			
		4.2.2.5	Ausblick	167		
	4.2.3	Molekula	re Analyse der physiologischen Bedeutung von SOCS2			
		in den pankreatischen β-Zellen169				
		4.2.3.1	Wirkung von SOCS2 auf die Proliferation pankreatischer			
			β-Zellen	171		
		4.2.3.2	Physiologische Funktion von SOCS2 in der zytokin-			
			induzierten Apoptose insulinproduzierender β-Zellen	173		
		4.2.3.3	Einfluss von SOCS2 auf den Glukosemetabolismus	174		
		4.2.3.4	Ausblick	176		
5.	Literat	turverze	ichnis	177		
Publik	ationen			208		

Danksagung	
Lebenslauf	
Erklärung	

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AUC	area under the curve
β-ΜΕ	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaar(e)
BrdU	5´-Brom-2´-Deoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CDK	cyclin-dependent kinase
CDS	coding sequence
CIAP	calf intestinal alkaline phosphatase
CMV	Zytomegalievirus
COMMD7	COMM domain containing 7
Cy2	Carbocyanin
СуЗ	Indocarbocyanin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
db	diabetic
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreit
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENY2	enhancer of yellow 2 homolog
EPO	Erythropoietin
et al.	et altera

etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
G418	Geneticindisulfat
GFP	grünfluoreszierendes Protein
GH	growth hormone, Somatotropin
GTT	Glukosetoleranztest
h	Stunde(n)
Hoechst33342	bisBenzimid-H33342-Trihydrochlorid
IFN	Interferon
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IL	Interleukin
ір	intraperitoneal
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
ITT	Insulintoleranztest
iv	intravenös
JAK	Janus-Kinase
Km	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
I	Liter
LB	Luria-Bertani
LIF	leukemia inhibitory factor
Μ	molar
m	milli, 10 <sup>-3</sup>
μ	mikro, 10 <sup>-6</sup>
МАРК	mitogen-activated protein kinase
MCS	multiple cloning site
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
min	Minute(n)
MG	Molekulargewicht
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-
	bromid

n	nano, 10 <sup>-9</sup>
neo	Neomycin
NF-кВ	nuclear factor-κΒ
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
NTP	Nukleotidtriphosphat
OPG	Osteoprotegerin
ORF	open reading frame
р	piko, 10 <sup>-12</sup>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
p.a.	pro analysis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
РК	Positivkontrolle
PL	Plazentares Laktogen
PRL	Prolaktin
PVDF	Polyvinyldifluorid
RANK	receptor activator of NF-kB
RANKL	receptor activator of NF-kB ligand
RIK	RIKEN cDNA 1110008P14 gene
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunde(n)
siRNA	small interfering RNA
SOCS	suppressor of cytokine signaling
sqRT-PCR	semi-quantitative Real-Time-PCR
STAT	signal transducer and activator of transcription
STZ	Streptozotocin
t	Zeitpunkt
Tab.	Tabelle

TCF25	transcription factor 25
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R2	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor
TRAP	tartrate-resistant acid phosphatase
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Polyoxymethylenether
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
u.a.	unter anderem
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt
VE	voll entsalzt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
X <sup>R</sup>	Resistenz gegen das Antibiotikum X
z.B.	zum Beispiel
ZNRF2	zinc and ring finger 2

#### Zusammenfassung

Der Typ-2-Diabetes mellitus ist durch eine chronische Hyperglykämie charakterisiert, welche auf eine Kombination aus peripherer Insulinresistenz und Dysfunktion der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas zurückzuführen ist. Um eine bessere Prävention und Therapie dieser häufig vorkommenden Stoffwechselerkrankung zu ermöglichen, war es das Ziel der vorliegenden Dissertation, neue Aspekte der  $\beta$ -Zelldysfunktion in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus aufzuklären.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten auf zellulärer Ebene am Typ-2-Diabetesmodell der db/db-Maus neue Erkenntnisse über die sequenzielle Abfolge von Ereignissen gewonnen werden, welche sich im endokrinen Pankreas bei der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes abspielen. Durch den direkten Vergleich diabetesresistenter db/db-Mäuse mit C57BL/6J-Hintergrund (db/db B6) und diabetessuszeptibler db/db-Mäuse mit C57BLKS/J-Hintergrund (db/db BKS) wurde erstmalig gezeigt, dass beide Mausstämme eine ähnlich ausgeprägte Insulinresistenz aufweisen und zunächst in der Lage sind, den dadurch erhöhten Insulinbedarf effektiv zu kompensieren. Der sich ab einem Alter von 9 Wochen bei db/db BKS-Mäusen manifestierende Typ-2-Diabetes ist auf einer altersbedingten, inadäquaten Expansion der β-Zellmasse begründet, welche aus einer abnehmenden β-Zellhyperproliferation und einer signifikant gesteigerten Apoptose der  $\beta$ -Zellen resultiert. Da kompensatorische Defizite der  $\beta$ -Zellmasse möglicherweise auch die humane Typ-2-Diabetesentstehung entscheidend beeinflussen, ist bei prädisponierten Personen eine frühzeitige therapeutische Unterstützung der β-Zellmasse als erfolgversprechende Maßnahme zur Prävention eines Typ-2-Diabetes mellitus vorstellbar.

Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollten neue Gene identifiziert werden, die eine regulatorische Funktion in den  $\beta$ -Zellen einnehmen und deshalb mögliche Angriffspunkte für neue Therapieformen der  $\beta$ -Zelldysfunktion beim Typ-2-Diabetes darstellen. In Voruntersuchungen wurden die Proteine OPG (Osteoprotegerin) und SOCS2 ("suppressor of cytokine signaling 2") zur genaueren Analyse ausgewählt.

Die Hypothese einer positiven Regulatorfunktion von OPG in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen konnte zunächst durch die Feststellung einer zeitlichen Korrelation zwischen der  $\beta$ -zellspezifischen OPG-Expression und den kompensatorischen  $\beta$ -Zellverände-

rungen während der murinen Schwangerschaft bekräftigt werden. *In vitro*-Versuche an den Insulinomzelllinien Ins-1E und MIN6 sowie an isolierten C57BL/6-Pankreasinseln ergaben, dass das Sekretionsprotein OPG keinen signifikanten Einfluss auf die glukosestimulierte Insulinsekretion und Proliferation von  $\beta$ -Zellen ausübt. OPG wird jedoch durch Zytokine in Ins-1E-Zellen induziert und schützt diese Zellen partiell vor einer IL-1 $\beta$ -induzierten Apoptose. Somit kann eine Rolle von OPG als autokriner Überlebensfaktor pankreatischer  $\beta$ -Zellen postuliert werden. Dieser protektive Effekt geschieht vermutlich unabhängig von den klassischen OPG-Liganden RANKL und TRAIL über eine Inhibierung der IL-1 $\beta$ -induzierten MAP-Kinasen JNK1/2, p38 und ERK1/2.

Die physiologische Funktion von SOCS2 wurde sowohl *in vivo* an SOCS2-Knockout-Mäusen als auch *in vitro* an Ins-1E-Zellen und isolierten Pankreasinseln untersucht. Dabei konnte kein signifikanter Einfluss von SOCS2 auf die GH-induzierte  $\beta$ -Zellproliferation und die zytokininduzierte Apoptose der  $\beta$ -Zellen demonstriert werden. Unter Anwendung glukosestimulierter Insulinsekretionsversuche und Glukosetoleranztests wurde des Weiteren nachgewiesen, dass SOCS2 weder *in vitro* noch *in vivo* die Funktion von  $\beta$ -Zellen signifikant beeinflusst. Auch ein Effekt von SOCS2 auf die Insulinsensitivität konnte an SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäusen ausgeschlossen werden. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass SOCS2 - im Gegensatz zu SOCS1 und SOCS3 keine nicht-kompensierbaren Effekte auf die Physiologie pankreatischer  $\beta$ -Zellen und auf den Glukosemetabolismus ausübt. Erklärt werden kann dies wahrscheinlich durch die hohe Redundanz innerhalb der SOCS-Proteinfamilie.

Zusammenfassend tragen die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zu einem besseren Verständnis der pankreatischen β-Zellphysiologie und der Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus bei und ermöglichen es dadurch, die diesbezügliche Entwicklung präventiver und therapeutischer Maßnahmen voranzutreiben.

XIV

# 1. Einleitung

## 1.1 Insulin und die Physiologie der Glukosehomöostase

Das Hexosemolekül Glukose stellt eine zentrale Energiequelle des menschlichen Körpers dar, so dass eine Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase insbesondere zur Versorgung des Gehirns von entscheidender Bedeutung ist. Unter normoglykämischen Bedingungen beträgt die Nüchternglukosekonzentration im Blut zwischen 70 mg/dl (= 3,9 mM) und 100 mg/dl (= 5,6 mM) und untersteht einer Vielzahl interner Regulationsmechanismen. Eine wichtige regulatorische Rolle spielt dabei das endokrine Pankreas. Dieses im Menschen aus circa einer Million sogenannter Langerhans scher-Inseln bestehende, stark vaskularisierte und innervierte Inselorgan liegt verstreut im exokrinen Pankreas und nimmt ein bis zwei Prozent des gesamten Pankreasvolumens ein. Die Inseln setzen sich größtenteils aus glukagonproduzierenden  $\alpha$ -Zellen (circa 40 %) und den insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen (circa 50 %) zusammen. Somatostatinsezernierende  $\delta$ -Zellen, PP-Zellen (Pankreatisches Polypeptid) sowie die erst vor einigen Jahren im Pankreas entdeckten ghrelinproduzierenden  $\epsilon$ -Zellen treten vereinzelt auf und nehmen jeweils nur einen geringen Anteil des endokrinen Zellverbandes ein (Steiner *et al.*, 2010; Wierup *et al.*, 2002).

#### 1.1.1 Insulinbiosynthese

Das 1921 erstmals von F. Banting und C. Best extrahierte Peptidhormon Insulin besitzt ein Molekulargewicht von knapp 6 kDa und setzt sich strukturell aus einer 21 Aminosäuren langen A-Kette sowie einer 30 Aminosäuren umfassenden B-Kette zusammen, welche über zwei intermolekulare Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Banting & Best, 1990). Eine zusätzliche intramolekulare Disulfidbrücke existiert innerhalb der A-Kette (Derewenda *et al.*, 1989). Insulin wird zunächst als Präproinsulin an den Ribosomen des rauhen Endoplasmatischen Retikulums (ER) der pankreatischen  $\beta$ -Zellen mit einer aminoterminalen Signalsequenz translatiert, mit deren Hilfe die Translokation in das Lumen des ER vonstattengeht (Chan *et al.*, 1976). Nach proteolytischer Abspaltung des Signalpeptides erfolgt die Faltung des Insulinvorläufermoleküls zum inaktiven Proinsulin (Steiner *et al.*, 1967). Die weitere Prozessierung zum aktiven Insulin geschieht durch Entfernung des C-Peptides ("connecting peptide") mittels spezifischer Peptidasen in den Sekretgranula des Golgi-Apparates, in denen Insulin in Form kristalliner, zinkgebundener Hexamere bis zu seiner Sekretion gespeichert wird (Davidson *et al.*, 1988; Dodson & Steiner, 1998; Dunn, 2005).

#### 1.1.2 Insulinsekretion

Die Ausschüttung von Insulin wird durch eine Reihe von Faktoren gesteigert, zu denen sowohl postprandial erhöht konzentrierte Aminosäuren und freie Fettsäuren zählen als auch Impulse des parasympathischen Nervensystems. Einige gastrointestinale Hormone wie Gastrin, die Inkretinhormone GLP-1 ("glukagon-like peptide-1") und GIP ("glucose-dependent insulinotropic peptide") sowie die Insulingegenspieler Glukagon, Kortisol und Adrenalin fördern ebenfalls die Insulinsekretion (Ashcroft & Randle, 1968; Creutzfeldt, 2001). Unter physiologischen Bedingungen ist jedoch ein Anstieg des Blutglukosespiegels (≥ 107 mg/dl bzw. ≥ 6 mM) der primäre Stimulus für die pankreatischen  $\beta$ -Zellen zur Freisetzung von Insulin (Jensen *et al.*, 2008). Der Effekt der Glukose ist dabei direkt an den Metabolismus der  $\beta$ -Zellen gekoppelt, d.h. ein Anstieg der Blutglukose zieht einen verstärkten Glukosemetabolismus der β-Zelle nach sich, der an eine entsprechende Insulinsekretion gekoppelt ist. Eine entscheidende Rolle spielen dabei die in hoher Dichte in der β-Zellmembran verankerten GLUT2-Transmembranproteine. Über diese niedrigaffinen Transporter (K<sub>m</sub> ~ 15 bis 20 mM) erfolgen das "Glukosesensing" und ein insulinunabhängiger Transport der Glukosemoleküle vom Blut in die β-Zellen (Newgard & McGarry, 1995), wo sie zur Verstoffwechselung in die Glykolyse eingeschleust werden. Die Umsatzrate wird von einem oft als Glukosesensor bezeichneten Enzym, der Glukokinase, festgesetzt (Matschinsky, 1996). Diese weist ebenfalls eine relativ niedrige Glukoseaffinität (K<sub>m</sub> ~ 8 mM) auf und katalysiert den ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Glykolyse, die Phosphorylierung der Glukose. Das aus der Glykolyse entstandene Endprodukt Pyruvat wird schließlich in die mitochondriale Matrix importiert, in AcetylCoA umgesetzt und in dieser Form in den Zitratzyklus eingeschleust. Dort erzeugte Reduktionsäquivalente, NADPH<sub>2</sub> und FADH<sub>2</sub>, werden in den Komplexen der mitochondrialen Atmungskette zur Sauerstoffreduktion und zum Aufbau eines Protonengradienten genutzt (Mitchell & Moyle, 1967). Mit dessen Hilfe erfolgt schließlich die ATP-Generierung durch das Enzym

ATP-Synthase, so dass der gesteigerte Stoffwechsel der  $\beta$ -Zelle insgesamt zu einem deutlichen Anstieg der Adenosintriphosphatmoleküle bei gleichzeitiger Abnahme von Adenosindiphosphat führt. Diese veränderte ATP-ADP-Ratio im Zytoplasma bewirkt eine Schließung ATP-abhängiger Kaliumkanäle und eine daraus resultierende Depolarisierung der Plasmamembran, welche die Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle zur Folge hat. Die dadurch vermehrt einströmenden Kalziumionen führen schließlich zur Fusion der insulinspeichernden Vesikel mit der Plasmamembran und somit zur Exozytose von Insulin in die Blutbahn (Abb. 1.1) (Jensen *et al.*, 2008).



<u>Abb. 1.1</u>: Glukosestimulierte Insulinsekretion einer pankreatischen β-Zelle. Nach insulinunabhängiger Aufnahme der Glukosemoleküle in die β-Zelle über GLUT2-Transporter (1) erfolgt die Verstoffwechselung der Glukose über Glykolyse, Zitratzyklus und oxidativer Phosphorylierung in der mitochondrialen Atmungskette (2). Infolgedessen kommt es zu einem Anstieg der ATP-Konzentration im Zytosol, der ein Schließen ATP-abhängiger Kaliumkanäle bewirkt (3). Die daraus resultierende Depolarisierung der Plasmamembran führt zur Öffnung spannungsabhängiger Kaliumkanäle (4). Der Einstrom extrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Ionen erhöht die zytosolische Kalziumkonzentration, welche die Exozytose insulinspeichernder Vesikel auslöst (5).

Unter physiologischen Bedingungen zeigt die Insulinausschüttung einen biphasischen Verlauf. In der ersten, etwa 10-minütigen Phase, welche bereits nach drei bis fünf Minuten ihr Maximum erreicht, findet unmittelbar nach Stimulation

(Nahrungsaufnahme) eine starke Sekretion gespeicherter Insulinmoleküle statt. Die länger anhaltende zweite Phase verläuft auf einem niedrigeren Sekretionsniveau und kann sich bis zur erzielten Rekonstitution eines normoglykämischen Blutzuckerspiegels über eine Dauer von mehreren Stunden erstrecken. Dabei werden nicht nur gespeicherte, sondern vor allem auch neugebildete Insulinmoleküle sezerniert (Rorsman & Renstrom, 2003). Die Insulinausschüttung erfolgt zudem in pulsatilen kurzen Wellen, aus welchen ein periodischer Abfall des Insulinspiegels resultiert. Diese Schwankungen führen zu einer verbesserten Insulinsensibilität der Zielzellen und sind deshalb für eine möglichst effiziente Insulinwirkung von großer Bedeutung (Porksen, 2002).

#### 1.1.3 Metabolische Effekte von Insulin

Insulin vermittelt seine Vielzahl von Wirkungen an den Zielorganen Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe durch reversible Bindung an den Insulinrezeptor und der daraus resultierenden Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden (Abb. 1.2). Gleiches gilt für autokrine Effekte an den  $\beta$ -Zellen und dem Pankreas (Leibiger *et al.*, 2008). Dabei werden vor allem zwei Ziele angestrebt: Die Entfernung von Glukose aus dem Blut durch deren erleichterte Aufnahme in die insulinabhängigen Gewebe sowie eine Blockierung der hepatischen Glukoseabgabe ins Blut.

In den Hepatozyten, welche Glukose insulinunabhängig über GLUT2-Transporter aufnehmen, bedeutet dies eine verstärkte Glykogen- und Lipidsynthese sowie Stimulation der Glykolyse bei gleichzeitiger Inhibierung der Glykogenolyse und Glukoneogenese (Pilkis & Granner, 1992). Zusätzlich werden, wie auch im Muskelgewebe, vermehrt Aminosäuren für die Synthese von Proteinen importiert. Die insulinvermittelte erleichterte Diffusion von Glukose ins Zytoplasma von Adipozyten und Myozyten geschieht durch eine verstärkte Rekrutierung hochaffiner GLUT4-Transporter zur Plasmamembran (Huang & Czech, 2007). Des Weiteren induziert Insulin eine gesteigerte Aufnahme freier Fettsäuren für die Lipogenese. Jeweils entgegengesetzte Reaktionen wie die Lipolyse und Proteolyse werden blockiert. Unterstützt werden die anabolischen Effekte des von den pankreatischen  $\beta$ -Zellen sekretierten Hormons durch dessen direkte Wirkung an den benachbarten  $\alpha$ -Zellen, in denen es die Produktion und Sekretion des katabolen Hormons Glukagon inhibiert.



<u>Abb. 1.2</u>: Metabolische Wirkungen von Insulin auf die insulinsensitiven Organe Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe. Insulin erleichtert die Aufnahme von Glukose, stimuliert die Proteinsynthese, Lipogenese, Glykogensynthese und Glykolyse. Glukoneogenese, Glykogenolyse, Proteolyse und Lipolyse werden inhibiert.

Alle Effekte von Insulin führen auf diese Weise letztendlich zu einer Senkung der Blutglukosekonzentration, so dass in einem gesunden Organismus postprandial gestiegene Blutzuckerspiegel (≤ 140 mg/dl bzw. ≤ 7,8 mM) wieder auf ein normales Glukoseniveau reduziert werden können (Saltiel & Kahn, 2001). Ist der Körper nicht mehr in der Lage ausreichende Mengen an Insulin zu produzieren und zu sekretieren, führt dies zur Störung der Glukosehomöostase und zur Entwicklung eines Diabetes mellitus.

#### 1.2 Diabetes mellitus

#### 1.2.1 Definition, Prävalenz und Sekundärkomplikationen

Unter dem Begriff Diabetes mellitus versteht man eine komplexe Regulationsstörung des Metabolismus, welche durch eine chronische Hyperglykämie charakterisiert ist. Nach den Leitlinien der Deutschen Diabetesgesellschaft gilt ein manifester Diabetes als diagnostiziert, wenn die venöse Plasmaglukosekonzentration entweder im nüchternen Zustand einen Wert von 126 mg/dl (= 7 mM) überschreitet oder zwei Stunden nach einer oralen Glukosebelastung (75 g) größer als 200 mg/dl (= 11 mM) ist (Kerner et al., 2004). Momentan sind schätzungsweise mehr als 230 Millionen Menschen weltweit von der Erkrankung betroffen (Zimmet et al., 2001; Reimann et al., 2009) und die Inzidenz nimmt weiter zu. In der deutschen Bevölkerung liegt die Prävalenz des Diabetes mellitus derzeit bei sieben bis acht Prozent (Giani et al., 2004). Trotz der Vielfalt an verfügbaren Therapiemöglichkeiten, mit denen eine effiziente Behandlung der primären Krankheitssymptome möglich ist, stellen chronische diabetische Sekundärkomplikationen weiterhin ein gravierendes Problem dar. Sie sind Hauptursachen der erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsraten von Diabetikern und lassen sich im Wesentlichen in mikrovaskuläre und makrovaskuläre Folgeerkrankungen differenzieren. Die durch pathologisch erhöhte Blutzuckerkonzentrationen ausgelöste Mikroangiopathie führt vorwiegend zur Schädigung der Augen (diabetische Retinopathie), der Nieren (diabetische Nephropathie) und des peripheren Nervensystems (diabetische Neuropathie). Die Makroangiopathie tritt zwar auch diabetesunabhängig auf, wird jedoch durch einen Diabetes mellitus stark begünstigt, so dass das Risiko für die Entwicklung von koronarer Herzkrankheit, Herzinfarkt, Schlaganfall, arterieller Hypertonie oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit bei Diabetikern deutlich erhöht ist (Hien & Böhm, 2007).

Aus ätiologischen Gesichtspunkten erfolgt die Klassifikation des Diabetes mellitus in folgende Hauptgruppen: Typ-1-Diabetes mellitus (Typ-1A immunologisch vermittelt oder Typ-1B idiopathisch), Typ-2-Diabetes mellitus, andere spezifische Diabetes-Typen (z.B. durch genetische Defekte der  $\beta$ -Zellfunktion oder Endokrinopathien) und Gestationsdiabetes (Alberti & Zimmet, 1998).

#### 1.2.2 Ätiologie und Pathogenese des Typ-1-Diabetes mellitus

Der Typ-1-Diabetes mellitus wird in 10 bis 15 % aller Diabeteserkrankungen diagnostiziert. Er tritt vorwiegend im Kindes- und Jugendalter auf, kann sich aber auch erst im Erwachsenenalter als sogenannter LADA-Diabetes ("latent autoimmune diabetes of the adult") manifestieren (Zimmet *et al.*, 1994; Daneman, 2006). Die absolute Insulinbedürftigkeit des in 90 % des Typ-1-Diabetes auftretenden Typ-1A resultiert aus einer autoimmunbedingten, progredienten Zerstörung der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas, welche möglicherweise bei einer bestimmten genetischen Veranlagung durch äußere Einflüsse ausgelöst wird. Wie aus Zwillingsforschungen und epidemiologischen Studien bekannt ist, sind beispielsweise Personen mit bestimmten HLA ("human leukocyte antigen")-Typen und anderen suszeptiblen Genloci für die Entwicklung eines Typ-1-Diabetes prädisponiert (Kaprio *et al.*, 1992; Gillespie *et al.*, 2004; Ounissi-Benkalha & Polychronakos, 2008). Als initiale Auslöser für die autoreaktive Immunantwort werden außerdem externe Faktoren wie Toxine, Immunstimulatoren und frühkindliche Ernährungskomponenten, besonders aber virale Infektionen (z.B. durch Enteroviren) diskutiert (Salminen *et al.*, 2003; Knip *et al.*, 2005).

Nach heutigem Kenntnisstand entwickelt sich die Erkrankung sehr langsam über eine mehrere Monate bis Jahre dauernde prädiabetische Phase, in welcher zirkulierende Insel- und β-Zellantikörper (z.B. Insulinautoantikörper, IAA) als erste Anzeichen eines ablaufenden Autoimmunprozesses erkennbar sind. Diese meist schon fünf Jahre vor dem Auftreten erster klinischer Symptome nachweisbaren β-Zellantikörper könnten in Zukunft eine große Bedeutung für die Präventivmedizin besitzen, da heute bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung meist mehr als 80 % der gesamten β-Zellmasse irreversibel zerstört ist (Klöppel et al., 1985; Ziegler et al., 1999). Die genauen Mechanismen, welche zur selektiven Zerstörung der insulinproduzierenden β-Zellen führen, sind derzeit noch nicht vollständig geklärt. Wie weitestgehend aus Studien mit Mausmodellen des Typ-1-Diabetes bekannt ist, erfolgt zu Beginn der Pathogenese eine primäre Infiltration der Langerhans'schen Inseln durch Makrophagen und dendritische Zellen (Jansen et al., 1994; Burkart & Kolb, 1996). Diese APCs ("antigen presenting cells") wiederum bewirken durch Präsentation MHC-II-gebundener β-Zellantigene und Freisetzung von Entzündungsmediatoren eine Rekrutierung und Aktivierung weiterer Immunzellen, vor allem von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (Pearl-Yafe et al., 2007). Aus der zunächst nichtdestruktiven, eher an der Peripherie der Inseln lokalisierten Entzündung ("Peri-Insulitis") entwickelt sich schließlich eine "Intra-Insulitis", die vorwiegend durch Apoptose zum Tod der β-Zellen führt (Mauricio & Mandrup-Poulsen, 1998; Eizirik & Mandrup-Poulsen, 2001). Neben der Aktivierung des Fas-Signaltransduktionsweges und der Freisetzung zytotoxischer Perforin/Granzyme-Granula spielt auch die Produktion reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies dabei eine entscheidende Rolle (Pirot et al., 2008). Von essentieller Bedeutung sind auch die von den reaktiven

Immunzellen sezernierten proinflammatorischen Zytokine wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Diese aktivieren nach Interaktion mit ihrem spezifischen Zytokinrezeptor über ein komplexes Netzwerk diverser Signaltransduktionskaskaden bestimmte MAP-Kinasen ("mitogen-activated protein kinases"), die Transkriptionsfaktoren STAT-1, AP-1 und NF- $\kappa$ B sowie verschiedene Effektorcaspasen und induzieren auf diesem Weg den programmierten Zelltod der  $\beta$ -Zellen (Thomas & Kay, 2000; Eizirik & Mandrup-Poulsen, 2001; Pirot *et al.*, 2008).

#### 1.2.3 Atiologie des Typ-2-Diabetes mellitus

Mit einem Anteil von 85 bis 90 % stellt der Typ-2 weltweit die häufigste Form des Diabetes mellitus dar (Gerich, 2003). Die Ursachen der oft im Zusammenhang mit Adipositas, arterieller Hypertonie und Dyslipidämie im Rahmen des Metabolischen Syndroms auftretenden Stoffwechselstörung sind vielfältig (Miranda et al., 2005). Wie man aus dem Vergleich von Prävalenzraten verschiedender Völker und aus interfamiliären Beobachtungen weiß, ist eine genetische Disposition dabei von großer Bedeutung (Odugbesan et al., 1989; Suchindran et al., 2009). So entwickeln beispielsweise bei eineiigen Zwillingen in 90 % der Fälle beide Geschwister einen Typ-2-Diabetes mellitus. Des Weiteren besitzen Geschwister von Typ-2-Diabetikern oder Kinder eines daran erkrankten Elternteils ein 40 %-iges Risiko, im Laufe ihres Lebens an einem Typ-2-Diabetes mellitus zu erkranken (Barnett et al., 1981). In genomweiten Assoziationsstudien konnte außerdem, basierend auf dem Vergleich bestimmter Einzelnukleotidpolymorphismen, eine Reihe suszeptibler Genloci (z.B. TCF7L2, INS, IRS-1, PPARy) identifiziert werden (Sladek et al., 2007; Zeggini et al., 2007). Der Großteil der genetischen Faktoren ist jedoch noch unbekannt. Die Manifestation eines Typ-2-Diabetes bedarf neben einer komplexen Interaktion verschiedener Gene meist auch des Zusammenspiels eines zunehmenden Alters und externer Risikofaktoren. Neben einer falschen Ernährungsweise und einem Mangel an körperlicher Bewegung spielt die oftmals daraus resultierende Fettleibigkeit (Adipositas) eine wesentliche Rolle. Da der moderne westliche Lebensstil der letzten Jahrzehnte durch letztere Faktoren geprägt ist, sind von der früher meist ab einem Alter von 40 Jahren auftretenden Krankheit zunehmend auch Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene betroffen (Alberti et al., 2004). Im Gegensatz zur absoluten Insulinbedürftigkeit des Typ-1-Diabetikers kann jedoch die relative Insulindefizienz

des Typ-2-Diabetikers häufig zunächst gut durch eine Ernährungsumstellung, körperliche Aktivität und den Einsatz oraler Antidiabetika behandelt werden (Pan *et al.*, 1997; Reimann *et al.*, 2009).

#### 1.2.4 Tiermodelle zur Untersuchung des Diabetes mellitus

Die Möglichkeit von *in vivo*-Untersuchungen zur Aufklärung der Pathogenese des Diabetes mellitus, insbesondere der pankreatischen Komponenten, ist am Menschen aus verständlichen Gründen sehr limitiert. Da meist auch im Rahmen von Autopsien nur wenige und unzureichende Erkenntnisse gewonnen werden können, ist die Forschung weitestgehend auf *in vitro*-Versuche oder auf die Durchführung von Tierstudien angewiesen.

Der Großteil des bisherigen Wissens über die Pathogenese des Typ-1-Diabetes mellitus basiert auf Beobachtungen spezieller Tiermodelle, die entweder spontan eine derartige Erkrankung entwickeln oder bei denen durch Applikation bestimmter Substanzen gezielt ein Typ-1-Diabetes ausgelöst wird. Zu den am häufigsten verwendeten Tiermodellen mit einer spontanen Krankheitsentwicklung ähnlich dem humanen Typ-1-Diabetes zählen momentan die NOD ("non-obese diabetic")-Maus, die BB ("bio breeding")-Ratte sowie die LEW.1AR1/Ztm-iddm-Ratte (Nakhooda et al., 1977; Thomas & Kay, 2000; Lenzen et al., 2001). Für eine experimentelle Diabetesinduktion in anderen Versuchstieren haben sich Alloxan und Streptozotocin (STZ) durchgesetzt. Streptozotocin ist eine zu den Glucosaminen und den Nitrosoharnstoffen gehörende, natürlich vorkommende Substanz, welche über die GLUT2-Transporter in die pankreatischen  $\beta$ -Zellen aufgenommen wird, dort akkumuliert und durch Alkylierung der DNA-Moleküle Schäden verursacht, die schließlich zum Tod der Zellen führen. Aufgrund dieser spezifischen β-Zelltoxizität wird STZ häufig auch als Zytostatikum zur Behandlung von Insulinomen eingesetzt (Lenzen, 2008). Während eine einmalige Injektion hoher Dosen STZ wahrscheinlich aufgrund der direkten β-Zellwirkung einen Diabetes induziert, wird bei der sogenannten "Multiple-low-dose-STZ"-Methode (MLSD), ähnlich einem humanen Typ-1-Diabetes, eine immunmediierte Zerstörung der  $\beta$ -Zellen hervorgerufen (Paik *et al.*, 1982).

Zur Erforschung des Typ-2-Diabetes mellitus existiert mittlerweile ebenfalls eine Vielfalt geeigneter Tiermodelle (Rees & Alcolado, 2005). Durch selektive Inzucht von

Tieren mit einem spontan auftretenden, dem humanen Typ-2-Diabetes ähnlichen Phänotyp, entstanden - wie beispielsweise im Fall der Goto-Kakizaki (GK)-Ratte - Tiere, die aufgrund einer peripheren Insulinresistenz oder/und einer verschlechterten Insulinsekretion eine chronische Hyperglykämie entwickeln (Goto *et al.*, 1976). Bei anderen Tiermodellen ist die Diabetesentstehung hingegen auf eine bekannte Mutation in einem einzelnen Gen zurückzuführen. Bekannte Beispiele dafür sind Tierstämme, die aufgrund einer Dysregulation im "Leptinsignaling" Adipositas und periphere Insulinresistenz entwickeln (Halaas *et al.*, 1995; Pelleymounter *et al.*, 1995). Die Ursache der Stoffwechselstörung ist dabei entweder - wie im Fall der ob/ob-Maus (ob = obese) - auf einen Defekt in der Produktion des Leptinproteins zurückzuführen oder - wie bei der Zucker fatty (fa/fa)-Ratte und der db/db-Maus (db = diabetic) - im Fehlen funktionsfähiger Leptinrezeptoren begründet (Ingalls *et al.*, 1950; Hummel *et al.*, 1966; Bray, 1977; Takaya *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996).

### Rolle der β-Zelle in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus

Die dem Typ-2-Diabetes mellitus zugrunde liegenden Pathomechanismen beruhen auf einer Kombination aus peripherer Insulinresistenz und  $\beta$ -Zelldysfunktion (Kahn, 2000). Der durch eine verminderte Wirkung normaler Konzentrationen von zirkulierendem Insulin definierte Zustand der Insulinresistenz kann bei vielen Patienten bereits vor Diagnose einer Glukoseintoleranz festgestellt werden (Saltiel, 2000). Er steht in enger Korrelation mit einer abdominalen Adipositas und den damit assoziierten, leichten, chronischen Entzündungsreaktionen (Wellen & Hotamisligil, 2005). Die genauen molekularen Faktoren und Mechanismen, welche zur Entstehung einer Insulinresistenz führen, sind bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Man weiß jedoch aus verschiedenen Studien, dass von Adipozyten sekretierte Adipokine (z.B. Adiponektin, Leptin, Resistin) eine wichtige regulatorische Rolle in diesem Zusammenhang spielen (Yamauchi et al., 2001; Nakata et al., 2007). Neben intrazellulärem Stress und hohen Konzentrationen freier Fettsäuren führen von Immunzellen und Adipozyten sezernierte proinflammatorische Zytokine (z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1) zur Induktion verschiedener Signalwege. Diese bewirken unter anderem die Aktivierung von Kinasen, welche auf Ebene des Insulinrezeptors oder dessen Substrate eine Störung des Insulinsignalweges zur Folge hat (Tilg & Moschen, 2008;

Boura-Halfon & Zick, 2009). Doch obwohl mindestens 80 % der Typ-2-Diabetiker übergewichtig sind, bedingt eine Adipositas und/oder eine Insulinresistenz nicht zwingend die Entstehung einer Hyperglykämie. Wie die Mehrzahl insulinresistenter Übergewichtiger ohne Glukoseintoleranz bzw. Typ-2-Diabetes mellitus verdeutlicht, besitzen pankreatische  $\beta$ -Zellen zur Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase meistens die Fähigkeit, sich an die Insulinbedürfnisse des Organismus anzupassen (Gerich, 2000). Die Kompensierung eines gesteigerten Insulinbedarfs geschieht sowohl unter physiologischen Bedingungen (Schwangerschaft) als auch unter pathologischen Bedingungen (Adipositas) durch Veränderungen der  $\beta$ -Zellmasse und Modifizierung der  $\beta$ -Zellfunktionskapazität (Bone & Taylor, 1976; Parsons *et al.*, 1992; Polonsky, 2000).

Das als β-Zellmasse bezeichnete Gesamtvolumen der β-Zellen eines Organismus gibt in erster Linie Aufschluss über die Anzahl der pankreatischen β-Zellen, ist jedoch auch von der Größe der einzelnen β-Zellen abhängig. Die β-Zellmasse resultiert vor allem aus dem variablen Zusammenspiel von  $\beta$ -Zellneubildung und  $\beta$ -Zelltod, welches unter gleichbleibenden Insulinbedürfnissen für einen konstanten Umsatz der β-Zellen sorgt (Bonner-Weir, 2000b). In Situationen erhöhten Insulinbedarfs kann die β-Zellmasse zumindest bei jungen, gesunden Menschen und Tieren innerhalb kurzer Zeit durch Hyperplasie und Hypertrophie der β-Zellen adäquat vergrößert werden (Butler et al., 2003). Dies wird beispielsweise am nicht-diabetischen Tiermodell der Zucker fatty (fa/fa)-Ratte verdeutlicht, bei dem adipöse Tiere aufgrund einer Insulinresistenz eine vierfach höhere β-Zellexpansion zeigen als dünne Artgenossen (Pick et al., 1998). Ähnliche Erkenntnisse konnten im Rahmen humaner Autopsien gewonnen werden, die einen deutlichen Größenunterschied der β-Zellmasse Übergewichtiger gegenüber schlanker Personen aufwiesen (Butler et al., 2003). Während eine Expansion der β-Zellmasse in der Schwangerschaft vorwiegend durch die vermehrte Expression bestimmter Hormone (PRL, GH und PL) bedingt ist, wird sie adipositasassoziiert wahrscheinlich auch durch das Überangebot von Nährstoffen (Glukose, Aminosäuren, freie Fettsäuren) vermittelt. Andere Faktoren wie Inkretinhormone, Zellzyklusproteine (z.B. Zykline, CDKs und CDK-Inhibitoren) und insulinähnliche Wachstumsfaktoren (IGFs) spielen neben dem autokrinen Effekt von Insulin ebenfalls eine Rolle in der verstärkten Proliferation der β-Zellen (Lee & Nielsen, 2009). Bedeutsam für eine effektive Anpassung des Inselorgans ist neben der

expandierenden β-Zellmasse eine zusätzliche Funktionsoptimierung der einzelnen β-Zellen. Dies umfasst eine Verbesserung der Glukosesensibilität, des Glukosemetabolismus und der Insulinbiosynthese. Eine Verstärkung der basalen und postprandialen Insulinsekretion und daraus resultierende Hyperinsulinämien sind die Folge (Prentki & Nolan, 2006). Ist aufgrund einer genetischen Prädisposition keine Kompensierung eines chronisch gesteigerten Insulinbedarfs möglich, entwickeln sich hyperglykämische und hyperlipidämische Zustände. Während physiologische Glukose- und Lipidkonzentrationen eine zusätzliche toxische Wirkung. Diese Glukobzw. Glukolipotoxizität unterstützt die Entstehung einer β-Zelldysfunktion, welche als der entscheidende Faktor für den Übergang eines insulinresistenten, normoglykämischen Zustandes über ein Stadium der Glukoseintoleranz hin zum manifesten Typ-2-Diabetes mellitus gilt (Abb. 1.3) (Weyer *et al.*, 1999; Prentki & Nolan, 2006).



<u>Abb. 1.3</u>: Die Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus. Unter dem Einfluss genetischer und erworbener Faktoren entwickelt sich stufenweise über verschiedene Mechanismen ein Typ-2-Diabetes mellitus, der hauptsächlich durch eine periphere Insulinresistenz,  $\beta$ -Zelldysfunktion und Reduktion der  $\beta$ -Zellmasse charakterisiert ist.

Nach derzeitigem Kenntnisstand wird die β-Zelldysfunktion durch verschiedene, noch nicht eindeutig geklärte molekulare Mechanismen vermittelt. Oxidativer Stress spielt dabei eine zentrale Rolle. Der aufgrund einer chronischen Hyperglykämie ständig erhöhte Glukosemetabolismus in den β-Zellen verursacht eine mitochondriale Dysfunktion mit einer daran gekoppelten Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie beispielsweise Superoxiden oder Stickstoffmonoxid (Sakai et al., 2003). Dies geschieht vorwiegend durch eine Überbeanspruchung der mitochondrialen Atmungskette oder durch nicht-enzymatische Glykosylierungen, welchen oft ein verstärkter Glukosefluss durch den Sorbitol- und Hexosaminweg vorangeht (Kaneto et al., 1996). Für die ebenfalls durch Proteinglykierungen verstärkt generierten AGEs ("advanced glycation end products") konnte eine Assoziation mit diabetischen Spätkomplikationen nachgewiesen werden (Peppa & Vlassara, 2005). Da β-Zellen nur relativ geringe Mengen Antioxidantien (z.B. Katalase, Glutathionperoxidase) exprimieren können, besitzen sie eine starke Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress. Sie reagieren deshalb über Aktivierung verschiedener Stresssignalwege mit erhöhter Apoptosebereitschaft, Störung der Insulinbiosynthese und -sekretion sowie einer verstärkten Resistenz gegenüber autokrin wirksamem Insulin (Tiedge et al., 1997). Dementsprechend zeigen diabetische Patienten im Vergleich zu Gesunden eine signifikante Erhöhung oxidativer Stressmarker, welche mit einer Verschlechterung der glukoseinduzierten Insulinsekretion korrelieren (Shin et al., 2001). Ein weiterer Mechanismus, über den glykotoxische Effekte an pankreatischen ß-Zellen erzielt werden, ist die Stressinduktion im ER. Das aufgrund vieler zellulärer Funktionen wie Faltung und posttranslationale Modifikation neusynthetisierter Proteine bedeutsame ER wird angesichts der chronischen Hyperglykämie und dem dadurch dauerhaft erhöhten Insulinbedarf überfordert. Eine Akkumulation falschgefalteter Proteine und die Aktivierung protektiver Mechanismen im Rahmen der sogenannten "unfolded stress response" (UPR) sind die Folge. Lang anhaltender ER-Stress setzt jedoch die UPR zunehmend außer Kraft und induziert schließlich die Apoptose der β-Zellen (Marchetti et al., 2007; Eizirik et al., 2008). Das bei Typ-2-Diabetikern in erhöhten Konzentrationen nachgewiesene IAPP ("islet amyloid polypeptide") trägt vermutlich zusätzlich zur Beeinträchtigung der β-Zellfunktion bei. Da Amylin zusammen mit Insulin gespeichert und sekretiert wird, steigt bei extensiver Insulinsekretion auch die Menge toxischer Amyloidfibrillen, welche durch verstärkte Ablagerung in der Zytoplasmamembran der β-Zellen schließlich deren Apoptose induzieren (Lorenzo et al.,

1994). Ein dauerhafter Anstieg intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Spiegel sowie negative Feedback-Aktionen des Insulinsignaltransduktionsweges gelten zusätzlich als Mechanismen der Glukotoxizität. Chronisch erhöhte Lipide bzw. freie Fettsäuren verursachen nach derzeitigen Erkenntnissen nur in Kombination mit einer Hyperglykämie Schäden an den  $\beta$ -Zellen (Grill & Bjorklund, 2001; Poitout & Robertson, 2008).

Eine weitere wesentliche Komponente der Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus ist wahrscheinlich - ähnlich wie beim Typ-1-Diabetes mellitus - eine reduzierte  $\beta$ -Zellmasse. Wie anhand humaner Autopsien gezeigt wurde, ist die  $\beta$ -Zellmasse von Typ-2-Diabetikern ca. 40 % kleiner als die gesunder Menschen. Der Grad der Zerstörung ist dabei altersunabhängig, liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei ca. 25 % und nimmt im Verlauf der Krankheit stetig zu (Rahier *et al.*, 2008). Das Insulinsekretionsdefizit des Typ-2-Diabetes mellitus äußert sich nach Glukosestimulation zunächst in einem Verlust der ersten Phase der Insulinausschüttung und einer verzögerten zweiten Sekretionsphase (Gerich, 2003). Je nach Manifestationsgrad ist außerdem die Oszillationsrate der pulsatilen Insulinfreisetzung stark erhöht oder fehlt gänzlich (O'Meara *et al.*, 1993). Dazu kommt eine gestörte Biosynthese und Prozessierung von Insulin, welche durch eine verstärkte Freisetzung inaktiver Proinsulinmoleküle charakterisiert ist (Kahn & Halban, 1997).

Durch Insulinresistenz der peripheren Gewebe,  $\beta$ -Zelldysfunktion und Reduktion der  $\beta$ -Zellmasse resultiert letztendlich während der Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus ein progredientes, relatives Insulindefizit. Infolgedessen ist schließlich auch keine ausreichende Inhibierung der pankreatischen  $\alpha$ -Zellen mehr möglich, so dass trotz bereits bestehender Hyperglykämien eine verstärkte Sekretion des Insulingegenspielers Glukagon erfolgt. In Kombination mit der verschlechterten Glukoseaufnahme insulinabhängiger Gewebe führen dessen katabole Wirkungen (z.B. unkontrollierte Produktion und Abgabe von Glukose durch die Leber) auch im nüchternen Zustand zu den diabetesspezifischen, unphysiologisch hohen Blutzuckerspiegeln (Surampudi *et al.*, 2009).

## Veränderungen pankreatischer β-Zellen während der Schwangerschaft

Um die Energieversorgung des heranwachsenden Embryos zu gewährleisten, entwickelt sich in späten Phasen der Schwangerschaft eine Insulinresistenz der peripheren Gewebe. Diese tritt sowohl bei Nagetieren als auch beim Menschen auf und wird beispielsweise von plazentarem Somatotropin (GH) verursacht (Saudek *et al.*, 1975; Catalano *et al.*, 1998; Dominici *et al.*, 2005). Da pankreatische  $\beta$ -Zellen eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase spielen, finden unter physiologischen Bedingungen verschiedene Veränderungen der  $\beta$ -Zellen statt, die eine Kompensierung des erhöhten Insulinbedarfs ermöglichen (Abb. 1.4).



<u>Abb. 1.4</u>: Dynamische Veränderungen pankreatischer  $\beta$ -Zellen während und unmittelbar nach der Schwangerschaft von Mäusen. Zur Kompensierung des insulinresistenzbedingt erhöhten Insulinbedarfs kommt es in der zweiten Phase der Schwangerschaft zu einer Verstärkung der Insulinsekretion und einer Expansion der  $\beta$ -Zellmasse. Letztere wird durch eine gesteigerte Proliferation der  $\beta$ -Zellen verursacht und unmittelbar nach der Geburt (pp; post partum) durch eine erhöhte  $\beta$ -Zellapoptose auf das Ausgangsniveau reduziert.

Zu den bisher bekanntesten Induktoren dieser Anpassungsvorgänge zählen während einer Schwangerschaft hochregulierte Hormone (z.B. Prolaktin und plazentares Laktogen), die über noch weitestgehend unbekannte Signalkaskaden die Expression entsprechender Effektormoleküle regulieren (Rieck & Kaestner, 2010). Neben einer gesteigerten Glukosesensitivität, Insulinbiosynthese und Insulinsekretionskapazität der einzelnen  $\beta$ -Zellen umfassen die dadurch ausgelösten Veränderungen auch eine  $\beta$ -Zellexpansion. Die bei trächtigen Nagetieren um das 2- bis 4-fache wachsende  $\beta$ -Zellmasse ist auf eine signifikant erhöhte  $\beta$ -Zellproliferation sowie eine deutliche Hypertrophie der  $\beta$ -Zellen zurückzuführen. Innerhalb der ersten 10 Tage nach Geburt findet dann wieder eine Normalisierung der  $\beta$ -Zellmasse auf das vor der Schwangerschaft herrschende Basalniveau statt (Van Assche *et al.*, 1978; Parsons *et al.*, 1992; Parsons *et al.*, 1995; Sorenson & Brelje, 1997). Wie Studien an trächtigen Ratten zeigen konnten, ist die diesbezüglich zu beobachtende  $\beta$ -Zellinvolution maßgeblich von einer gesteigerten Apoptose der  $\beta$ -Zellen abhängig (Scaglia *et al.*, 1995).

Ist keine adäquate Kompensierung des erhöhten Insulinbedarfs möglich, so resultiert die Entstehung eines sogenannten Gestationsdiabetes, der beim Menschen in etwa 4 % aller Schwangerschaften diagnostiziert wird (Kerner *et al.*, 2004). Obwohl meist nach Geburt aufgrund der deutlichen Abnahme der Insulinresistenz wieder eine ungestörte Glukosetoleranz vorliegt, ist aus Langzeitstudien bekannt, dass etwa 70 % aller betroffenen Frauen im weiteren Verlauf einen Typ-2-Diabetes mellitus entwickeln (Kim *et al.*, 2002). Diese Tatsache sowie die Feststellung, dass die während einer Schwangerschaft zur Kompensierung ablaufenden β-Zellveränderungen gegensätzlich zu denen des Typ-2-Diabetes sind, lässt das Vorhandensein ähnlicher Regulationsmechanismen in beiden Situationen vermuten (Prentki & Nolan, 2006). Diese Regulationsmechanismen bzw. die daran beteiligten Regulatorproteine könnten deshalb Angriffspunkte für neue Präventions- oder Behandlungsformen des Typ-2-Diabetes mellitus darstellen.

#### 1.5 Osteoprotegerin

Das 1997 entdeckte Osteoprotegerin (OPG) ist ein lösliches Glykoprotein und zählt zur Familie der Tumornekrosefaktor-(TNF)-Rezeptoren (Simonet *et al.*, 1997; Tsuda *et al.*, 1997). Es umfasst insgesamt 401 Aminosäuren und besteht aus einem aminoterminalen Signalpeptid sowie sieben Hauptdomänen (Abb. 1.5). Die vier cysteinreichen Regionen (D1 bis D4) am N-Terminus besitzen eine hohe Sequenzhomologie zu anderen TNFR-Mitgliedern und sind für die Bindung an TNF-Proteine notwendig, während die Domänen D5 und D6 "death domain"-homologe Merkmale apoptosevermittelnder Proteine (z.B. Fas) aufweisen. Die am C-terminalen Ende lokalisierte Domäne (D7) enthält neben einer Bindungsstelle für Heparin einen Cysteinrest (Cys 400), der für die intrazellulär stattfindende Homodimerisierung der zunächst als Monomere (ca. 55 kDa) synthetisierten OPG-Moleküle notwendig ist. Eine hydrophobe Transmembrandomäne wie bei anderen TNFR-Proteinen existiert nicht (Simonet *et al.*, 1997; Yamaguchi *et al.*, 1998).



<u>Abb. 1.5</u>: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von Osteoprotegerin (OPG). Dargestellt sind das aminoterminale Signalpeptid, die sieben Hauptdomänen (D1 bis D7) sowie biochemische und funktionelle Eigenschaften.

Die erste und bisher bekannteste physiologische Funktion von OPG wurde in der Regulation des Knochenmetabolismus beschrieben, in dem es als sezernierter "decoy"-Rezeptor sowohl löslicher als auch membrangebundener Formen des TNF-Proteins RANKL ("receptor activator of NF-kB ligand") fungiert (Lacey et al., 1998). RANKL wird vorwiegend von Osteoblasten, aber auch von Stromazellen und aktivierten T-Lymphozyten exprimiert und vermittelt seine Effekte durch Bindung an seinen Rezeptor RANK ("receptor activator of NF-KB"), der auf der Oberfläche hämatopoetischer Zellen lokalisiert ist. Die durch Interaktion zwischen RANKL und RANK induzierte Differenzierung von Präosteoklasten und Aktivierung reifer Osteoklasten bewirkt eine verstärkte Knochenresorption (Hsu et al., 1999; Wong et al., 1999). Sekretiertes OPG, dessen Synthese neben einer Vielzahl von Geweben auch in Osteoblasten stattfindet, bindet RANKL und inhibiert auf diese Weise die stimulierenden Effekte von RANK auf die Osteoklastogenese (Udagawa et al., 2000; Kostenuik, 2005). Störungen eines ausgewogenen Verhältnisses zwischen RANKL und OPG haben deshalb oft die Pathogenese verschiedener Knochenerkrankungen zur Folge. Dies wird am Beispiel transgener OPG-Mäuse und OPG-defizienter Knockout-Mäuse deutlich, die durch eine ausgeprägte Osteopetrose bzw. eine postnatal auftretende Osteoporose charakterisiert sind (Simonet *et al.*, 1997; Bucay *et al.*, 1998). Neben der Inhibierung osteoklastischer Aktivitäten ist OPG auch in der Entwicklung der Lymphknoten, der Differenzierung von T-Lymphozyten und der Regulation des Kalziummetabolismus beteiligt (Kong *et al.*, 1999; Hofbauer & Heufelder, 2001). Seine Bedeutung in der Entstehung von Tumorzellen wird momentan noch kontrovers diskutiert (Zauli *et al.*, 2009). Obwohl OPG einer tumorassoziierten Knochenresorption entgegenwirken kann, scheint es das Wachstum und die Angiogenese von Tumorzellen zu fördern und zumindest *in vitro* einen protektiven Effekt auf einige Tumorzellarten auszuüben (Holen & Shipman, 2006). Letzteres geschieht durch kompetitive Bindung des TNF-Proteins TRAIL ("TNF-related apoptosis inducing ligand") und der dadurch vermittelten Inhibierung seiner proapoptotischen Effekte (Emery *et al.*, 1998; Macfarlane, 2003).

#### 1.6 Die Familie der SOCS-Proteine

#### 1.6.1 Der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg

Zytokine und Wachstumsfaktoren regulieren eine Vielzahl biologischer Prozesse wie die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen über die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden. Eine wichtige Rolle spielt dabei der sogenannte JAK/STAT-Signaltransduktionsweg (Abb. 1.6).

Die Initiation der Signalvermittlung über den JAK/STAT-Weg erfolgt durch extrazelluläre Interaktion des Liganden mit seinem spezifischen Rezeptor, welcher als Transmembranprotein in der Zytoplasmamembran der Zellen lokalisiert ist. Die dadurch hervorgerufene Aggregation und Konformationsänderung der Rezeptoruntereinheiten ermöglicht durch Transphosphorylierung die Aktivierung der rezeptorassoziierten Janus-Kinasen (JAKs). Aktivierte JAKs induzieren ihrerseits die Aktivierung des Rezeptors durch Phosphorylierung zytoplasmatischer Tyrosinreste, welche nun als Andockstellen für rekrutierte STAT ("signal transducer and activator of transcription")-Moleküle fungieren. Diese werden anschließend ebenfalls von den JAKs durch Phosphorylierung aktiviert und translozieren nach erfolgter Dimerisierung in den Zellkern, um dort durch Bindung spezifischer STAT-Elemente die Transkription verschiedener Zielgene zu regulieren (Darnell, Jr. *et al.*, 1994; Rawlings *et al.*, 2004).



<u>Abb. 1.6</u>: Schematische Darstellung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges. Die durch Bindung des Liganden an die extrazelluläre Domäne des transmembranen Rezeptors (1) induzierte Konformationsänderung führt zur Aktivierung rezeptorassoziierter Tyrosinkinasen der JAK-Familie (2). Diese erzeugen durch Phosphorylierung des Rezeptors Andockstellen für STAT ("signal transducer and activator of transcription)"-Moleküle (3), welche nach Bindung an den Rezeptor ebenfalls von JAKs phosphoryliert werden. Nach Dimerisierung der STATs erfolgt deren Translokation in den Nukleus (4), wo sie die Transkription bestimmter Gene regulieren (5).

Da eine exzessive Stimulation des JAK/STAT-Weges massive Zellschäden bis hin zum Tod der Zellen zur Folge hätte, ist die Aktivierung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges transient und in Bezug auf Stärke, Dauer und Spezifität der Signalübertragung verschiedenen Regulationsmechanismen unterworfen (Rakesh & Agrawal, 2005). Neben den konstitutiv exprimierten Proteinen der PIAS ("protein inhibitor of activated STAT")-Familie, welche ihre inhibitorische Funktion entweder auf Ebene der STAT-Dimerisierung oder der DNA-Bindungsaktivität ausüben, inaktivieren die ebenfalls konstitutiv exprimierten Proteine der SHP ("SH<sub>2</sub>-containing phosphatases")-Familie die Signaltransduktion durch Dephosphorylierung von Tyrosinresten (Jiao *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998). Die dritte bedeutsame Gruppe von Regulatoren des JAK/STAT-Weges stellen die Proteine der SOCS ("suppressor of cytokine signaling")-Familie dar (Hilton, 1999).

#### 1.6.2 Aufbau und physiologische Funktion der SOCS-Proteine

Die Familie der SOCS-Proteine wurde 1997 entdeckt und umfasst mindestens die acht bisher beschriebenen Proteine CIS ("cytokine-inducible SH<sub>2</sub>-containing protein") und SOCS1 bis SOCS7 (Endo *et al.*, 1997; Starr *et al.*, 1997; Naka *et al.*, 1997). Alle Mitglieder sind strukturell durch eine aminoterminale Domäne mit variabler Länge und Aminosäuresequenz, eine zentrale SH<sub>2</sub>-("Src-homology 2")-Domäne und eine hochkonservierte SOCS-Box am C-Terminus charakterisiert (Krebs & Hilton, 2001; Kile *et al.*, 2002). Am aminoterminalen Ende der SH<sub>2</sub>-Domäne von SOCS1 und SOCS3 ist zusätzlich eine KIR ("kinase inhibitory region")-Region lokalisiert (Abb. 1.7).

SOCS-Proteine zeigen eine geringe Basalexpression und werden sehr schnell nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen oder Wachstumsfaktoren STAT-abhängig hochreguliert, um anschließend ihre inhibitorische Wirkung auf den JAK/STAT-Weg auszuüben (Naka et al., 1997; Matsumoto et al., 1997; Saito et al., 2000). Sie agieren daher als intrazelluläre Inhibitoren im Rahmen eines klassischen, negativen "Feedback"-Mechanismus (Greenhalgh & Hilton, 2001). Ihre regulatorische Wirkung entfalten die verschiedenen SOCS-Proteine dabei auf unterschiedlichen Ebenen. SOCS1-Proteine binden über die SH<sub>2</sub>-Domäne aktivierte JAKs und inhibieren unter dem Einfluss der KIR-Domäne deren Kinaseaktivität, während SOCS3-Proteine für die Inhibierung der JAKs zusätzlich eine Bindung an den Rezeptor benötigen (Sasaki et al., 1999; Yasukawa et al., 1999). Im Gegensatz dazu blockieren SOCS2 und CIS, welche ähnlich wie STAT-Proteine über ihre SH<sub>2</sub>-Domäne an phosphorylierte Tyrosinreste des aktivierten Rezeptors binden können, durch eine kompetitive Bindung den Zugang für STAT-Moleküle und inhibieren auf diese Weise die Signalweiterleitung in den Nukleus (Yoshimura et al., 1995; Matsumoto et al., 1997; Dey et al., 1998). Der dritte Mechanismus über den SOCS-Proteine das "Zytokinsignaling" regulieren, basiert auf deren Fähigkeit über die SOCS-Box mit Elongin B/C, einer Komponente des E3-Ubiquitin-Ligasekomplexes, zu interagieren. Die dadurch vermittelte Ubiquitinierung der SOCS-gebundenen Substrate bewirkt schließlich deren proteosomalen Abbau. Dieser Mechanismus dient nicht nur der Degradierung von Zytokinrezeptoren, sondern auch der gegenseitigen Regulation unterschiedlicher SOCS-Proteine (Tannahill et al., 2005; Piessevaux et al., 2006).


<u>Abb. 1.7</u>: Schematische Darstellung der SOCS-Proteine. Alle acht bekannten Proteine (CIS, SOCS1 bis SOCS7) der SOCS-Familie besitzen einen variablen aminoterminalen Teil, eine zentrale SH<sub>2</sub>-Domäne (blau) zur Bindung von phosphorylierten Tyrosinresten und eine carboxyterminale SOCS-Box (grün) zur Bindung von Elongin B/C. Die Proteine SOCS1 und SOCS3 besitzen zusätzlich eine "kinase inhibitory region" (KIR; gelb) in der aminoterminalen Domäne zur Inhibierung der JAK-Kinaseaktivität.

Die Ergebnisse aus *in vitro*-Untersuchungen der SOCS-Familie zeichneten sich größtenteils durch ein hohes Maß an Redundanz und Pleiotropie aus. Somit wird meist nicht nur die Expression mehrerer SOCS-Proteine von denselben Zytokinen induziert, sondern es kann ebenso die Inhibierung eines breiten Spektrums verschiedener Zytokine durch einzelne SOCS-Mitglieder hervorgerufen werden (Krebs & Hilton, 2001). Um mehr Einblicke in die physiologische Funktion der unterschiedlichen SOCS-Proteine zu erhalten, wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl verschiedener transgener Mäuse und spezieller SOCS-Knockout-Mäuse generiert. Dennoch ist über die funktionelle Bedeutung der SOCS-Proteine SOCS4 bis SOCS7 sowie von CIS nur relativ wenig bekannt (Dalpke *et al.*, 2008).

Anhand von SOCS1-defizienten Mäusen, welche unter anderem durch eine mononukleäre Infiltration verschiedener Organe, eine Lymphopenie und einen Überschuss aktivierter T-Zellen gekennzeichnet sind, konnte eine inhibitorische Funktion der SOCS1-Proteine bezüglich des IFN-γ-Signaltransduktionsweges beschrieben werden (Starr *et al.*, 1998; Marine *et al.*, 1999b). Die von Metcalf *et al.* generierten SOCS2-Knockout-Mäuse hingegen entwickeln im Alter von etwa drei Wochen einen Phänotyp, der durch eine deutliche Gewichts- und Größenzunahme der meisten Organe und Knochen sowie durch eine verdickte Dermis aufgrund verstärkter

21

Kollagenakkumulationen charakterisiert ist. Dieser auch in transgenen SOCS2-Mäusen beobachtete Gigantismus lässt sich auf ein gestörtes "Signaling" der über den JAK/STAT-Signalweg regulierten Wachstumshormone GH und IGF-1 zurückführen (Metcalf *et al.*, 2000; Greenhalgh *et al.*, 2002b). Hinsichtlich des inhibitorischen Proteins SOCS3, dessen systemisches Fehlen ähnlich wie dessen Überexpression zur embryonalen Letalität führt, konnte eine Regulation in der fötalen Lebererythropoese sowie in der plazentaren Entwicklung nachgewiesen werden (Marine *et al.*, 1999a). Des Weiteren spielt es eine Rolle im IL-6- und im Leptinsignalweg (Yasukawa *et al.*, 2003; Howard *et al.*, 2004).

## 1.7 Wissenschaftliche Fragestellung

Der Typ-2-Diabetes mellitus hat mittlerweile weltweit epidemieähnliche Ausmaße angenommen. Trotz Fortschritten bei der Behandlung dieser Stoffwechselerkrankung ist eine effiziente Bekämpfung der schwerwiegenden Folgekomplikationen und hohen Mortalitätsraten bisher nur eingeschränkt möglich. Aus diesem Grund sind weitere Forschungen notwendig, um mehr Einblicke in die zellulären und molekularen Regulationsmechanismen der Glukosehomöostase und der Pathogenese des Diabetes mellitus zu erhalten. Da pankreatische  $\beta$ -Zellen eine zentrale Rolle in der Regulation des Glukosemetabolismus spielen, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der  $\beta$ -Zelldysfunktion in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes.

Diesbezüglich sollte im ersten Teil dieser Arbeit auf zellulärer Ebene die chronologische Abfolge von Ereignissen untersucht werden, die sich im endokrinen Pankreas eines Tiermodells bei der Entstehung eines Typ-2-Diabetes mellitus abspielt. Zu diesem Zweck sollten zwei leptinresistente db/db-Mausstämme verglichen werden, die aufgrund ihres unterschiedlichen genetischen Hintergrundes eine Suszeptibilität bzw. eine Resistenz gegenüber einer Diabetesentwicklung aufweisen. Dadurch sollten neue Erkenntnisse über die primären Mechanismen der Diabetesentstehung in diesem Modell gewonnen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten neue Gene bzw. Proteine identifiziert werden, die eine regulatorische Rolle in der Funktion und Expansion pankreatischer β-Zellen spielen und deshalb möglicherweise für die Pathogenese des Diabetes sowie als Zielmoleküle für eine Pharmakotherapie relevant sein könnten. Ein Vergleich der mRNA-Expressionsprofile Langerhans'scher Inseln trächtiger und nicht-trächtiger C57BL/6-Mäuse diente dabei als Ausgangspunkt zur Auswahl einiger Kandidaten, von welchen insbesondere OPG (Osteoprotegerin) und SOCS2 ("suppressor of cytokine signaling 2") funktionell genauer charakterisiert werden sollten. Diesbezüglich sollte getestet werden, ob diese beiden Proteine an der molekularen Regulation von Proliferation, glukosestimulierter Insulinsekretion und Apoptose von  $\beta$ -Zellen beteiligt sind. Die Untersuchungen sollten hauptsächlich *in vitro* an Insulinomzellen und isolierten Pankreasinseln stattfinden. Um die physiologische Funktion von SOCS2 in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen zu analysieren, standen zusätzlich SOCS2-Knockout-Mäuse zur Verfügung.

# 2. Material und Methoden

# 2.1 Materialien

# 2.1.1 Geräte

Agarosegel-Elektrophoresystem (MGU-402T)

Anatomische Pinzette, 115 mm Arterienklemme "Mosquito", 100 mm Blutzuckermessgerät Ascensia CONTOUR® **Brucheismaschine ZBE-250** Brutschrank APT-Line<sup>™</sup> KBF Bunsenbrenner **Drigalski-Spatel** Elektrophoresenetzgerät (E831) Entwicklungsmaschine CURIX 60 Impföse Kühl- und Gefriergeräte Kryostat CM 3050 S Mini-Protean 3 Cell System Microplate Reader (Magellan2) Magnetrührer IKA-Combimag RET Mikroskope: Standard-Labormikroskop BX41 Stereomikroskop SMZ-140 Stereomikroskop BO61 Axioskop 40 PxE Thermocycler pH-Meter Pipetten Pipetboy comfort Präparierscheren **Qubit Fluorometer** Schüttler: Kompaktschüttler KS15A mit Inkubationshaube

C.B.S. Scientific Company, Inc. Adolf Bausch Adolf Bausch Bayer AG Ziegra Binder Usbeck Merck Consort AGFA Greiner Liebherr Leica Microsystems **Bio-Rad** Tecan IKA Olympus Motic Olympus Carl Zeiss Thermo Scientific **HANNA Instruments** Eppendorf **IBS** Integra Biosciences Adolf Bausch Invitrogen Edmund Bühler GmbH

	Schüttelmaschine LS20	Gerhardt
Sonopuls Ult	raschall-Homogenisator HD2070	Bandelin
Sterilwerkbank LaminAir® HLB 2448 GS		Heraeus
UV Transillur	ninator	UVP Inc.
Vortexer:	Vortex genie2	Scientific industries, Inc.
<u>Waagen</u> :	Präzisionswaage TE412	Sartorius
	Analysewaage	Sartorius
Wasserbad		Medingen
<u>Zentrifugen</u> :	Labofuge 400R	Heraeus
	Mikro 200R Zentrifuge	Hettich

# 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid-Bis-Lösung (30 %)	Bio-Rad
Agarose Low Melt	Roth
Agarose (NEEO Ultraqualität)	Roth
Albuminfraktion V (BSA)	Roth
Ampicillin-Natriumsalz	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	Merck
Aqua ad iniectabilia	Braun
BrdU	Sigma-Aldrich
Calciumchloriddihydrat	Roth
Collagenase V (aus <i>Clostridium histolyticum</i> )	Sigma-Aldrich
Complete, EDTA-free (protease inhibitor cocktail tablets)	Roche
DAPI	Sigma-Aldrich
D-(+)-Glukose	Roth
Dimethylsulfoxid	Roth
DTT	Roth
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth
Essigsäure (100 %)	Roth
Ethanol abs.	Merck
Ethidiumbromid (1 %-Lösung)	Roth
Fast Red Violet LB salt	Sigma-Aldrich
Fluorescent Mounting Medium	Medac GmbH

Gelatine	Roth
Geneticindisulfat-Lösung (G418, 50 mg/ml)	Roth
Glycin	Roth
Glycerin	Roth
HEPES	Roth
Hoechst33342	Sigma-Aldrich
Insulin (human, 100 IE/ml)	Berlin-Chemie AG
Isofluran (Forene <sup>®</sup> )	Abbott AG
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kanamycinsulfat	Roth
Lipofectamin RNAi MAX	Invitrogen
LB-Agar	Roth
LB-Medium	Roth
Magnesiumchloridhexahydrat	Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methanol	Roth
Milchpulver	Roth
Naphtol AS-MX-Phosphat	R&D-Systems
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Normal donkey Serum	Jackson
	Immunoresearch
Normal goat Serum	Jackson
	Immunoresearch
dNTP Set, PCR Grade	Qiagen
Palmitinsäure	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich
Sigma-Aldrich
Roth
Roth
Roth
Sigma
Thermo Scientific
Roth
Sigma-Aldrich
Roth
Roth
PAA
Sigma-Aldrich
Roth
Roth
Roth

# 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units (Ultracel-30K)	Millipore
Ascensia CONTOUR <sup>®</sup> Teststreifen	Bayer AG
Borosilikatröhrchen (Ø 12mm, 2 ml)	Roth
Cellulose Chromatography Paper	Whatman
Cloning Cylinder (Pyrex 8,8 mm)	Corning
Deckgläser (18 x 18 mm; 24 x 32 mm)	Menzel-Gläser
Einfrierröhrchen	Nunc
Immobilon-PVDF-Membran (0,45 μm)	Millipore
Injektionskanüle (30G x ½)	Braun
Iris- und Fadenschere, gerade, 90 mm	Adolf Bausch
Microvette <sup>®</sup> di-Kalium-EDTA CB300	Sarstedt
Mullkompressen	Noba Verbandmittel
	Danz GmbH
Objektträger SuperFrost <sup>®</sup> Plus	VWR
PCR-Einzelgefäße (0,2 ml)	VWR

Petrischalen, unbehandelt, 60 mm (Inseln)	Nunc
Petrischalen mit Belüftungsnocken, 96 mm ( <i>E. coli</i> )	Roth
Pipettenspitzen mit Dualfilter (10µl/100µl/1000µl)	Neolab Migge
QIAshredder	Qiagen
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf
Röntgenfilme: Amersham Hyperfilm <sup>™</sup> ECL	GE Healthcare
Skalpelle	Feather
Spritzen BD Discardit <sup>™</sup> II (5 ml)	<b>BD</b> Biosciences
Sterilfilter (0,2 μm und 0,45 μm)	Millipore
4-Well-Multischalen, unbehandelt, 66 x 66 mm	Nunc
Zählkammer (Neubauer)	Hycor Biomedical Inc.
Zellschaber mit 2-Positionen-Klinge,16 cm/13,5 mm	Sarstedt
Zellkulturröhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner
Zellkulturschalen (Ø 10 cm und Ø 15 cm)	TPP
Zellkulturtestplatten (6-, 12-, 24- und 96-Wells)	TPP

# 2.1.4 Kits

# <u>ELISA</u>:

Rat/Mouse Insulin ELISA (EZRMI-13K)	Millipore
Ultra sensitive mouse Insulin ELISA (90080)	Crystal Chem. Inc.

# Konzentrationsbestimmung:

Quant-iT <sup>™</sup> dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen
Quant-iT <sup>™</sup> dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen
Quant-iT <sup>™</sup> RNA Assay Kit	Invitrogen
Quant-iT <sup>™</sup> Protein Assay Kit	Invitrogen

### Gentechnisches Arbeiten:

ImProm-II <sup>™</sup> Reverse Transcription System	Promega
Phusion <sup>TM</sup> Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase Kit	Finnzymes
Qiafilter Plasmid Midi Kit	Qiagen
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen

Qiaquick PCR-Purification Kit Quick Ligation Kit Quicklyse Miniprep Kit RNeasy Plus Mini Kit Taq PCR Core Kit Qiagen New England Biolabs Qiagen Qiagen Qiagen

#### Immunhistochemie:

Vectastain <sup>®</sup> ABC-AP-Kit	Vector Laboratories
Vector <sup>®</sup> NovaRED™ Substrate-Kit (für Peroxidase)	Vector Laboratories
QIA33 FragEL <sup>™</sup> DNA Fragmentation Detection Kit	Calbiochem

## 2.1.5 Puffer und Lösungen

#### Antibiotikalösungen:

Die zur Kultivierung von Bakterien notwendigen Antibiotikalösungen sowie deren jeweilige Konzentrationen und Lösungsmittel sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Die Kanamycin-Stammlösung wurde zusätzlich sterilfiltriert.

<u>Tab. 2.1</u>: Zusammenfassung der verwendeten Antibiotikalösungen. Angegeben sind jeweils Name, Konzentration der Stammlösung, Lösungsmittel sowie Endkonzentration des Antibiotikums.

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung [mg/ml]	Lösungsmittel	Endkonzentration [µg/ml]
Ampicillin	100	70 % EtOH (v/v)	50
Kanamycin	30	Aqua dest.	20

TAE-Puffer:	Tris	40 mM
	Acetat	20 mM
	EDTA	2 mM
	pH 8,1; ad Aqua dest.	
<u>TE-Puffer</u> :	Tris	10 mM
	EDTA	1 mM
	pH 8,0; ad Aqua dest.	

<u>PBS-Puffer</u> :	NaCl KCl	80 g 2 g		
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4 g		
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g		
	pH 7,4; ad Aqua de	est. 10 l		
TRS_Duffor	NaCl	140 mM		
		20 mM		
	nH 7 6	20 11101		
	pri 7,0			
Na-Acetat/Weinsäure-Puffer:	Na-Acetat	0,1 M		
	Weinsäure	50 mM		
	pH 5,2; ad Aqua dest.			
Lysepuffer:	HEPES	50 mM		
	Triton X-100	0,1 %		
	DTT	1 mM		
	ad Aqua dest.			
	Komplementierung	des Puffers unmittelbar vor		
	Gebrauch mit 1x P	roteaseinhibitor-Cocktail (Roche)		
Palmitat-Stammlösung:	5 mM Palmitat geb	unden an 5 % BSA		
Herstellung von <u>100 mM F</u>	Palmitat:			
	0,256 g Palmitat			
	10 ml NaOH (0,1 M	1)		
	lösen bei 70°C			
Herstellung von <u>5 % fetts</u>	<u>äurefreiem BSA</u> :			
	0,5 g fettsäurefreies	s BSA		
	10 ml Aqua dest.			
<u>Beladung von Palmitat m</u>	it BSA:			
	9,5 ml fettsäurefrei	e BSA-Lösung (5 %; 60°C warm)		
	500 µl Palmitat (10	0 mM; 70°C warm); sterilfiltrieren		

NaCl

KRBH-Puffer:

für Ins-1E-Zellen:

für	MIN6-Zellen/Inseln:

KCI	4,75 mM		
CaCl <sub>2</sub>	1 mM		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 mM		
MgSO <sub>4</sub>	1,2 mM		
NaHCO <sub>3</sub>	5 mM		
HEPES	25 mM		
pH 7,4, ad Aqua de	st. 1 I		
Komplementierung	des Puffers unmittelbar vor		
Gebrauch mit 0,2 %	6 BSA		
NaCl	135 mM		
	3.6 mM		
	1.5 mM		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 mM		
MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM		
NaHCO <sub>3</sub>	5 mM		
HEPES	10 mM		
pH 7,4, ad Aqua de	st. 1 I		
Komplementierung	des Puffers unmittelbar vor		
Gebrauch mit 0,2 %	6 BSA		

125 mM

Isolation Langerhans'scher Inseln:

Folgende Lösungen sind für die Inselisolation eines Mauspankreas ausreichend:

<u>Medium A</u> :	Hanks´ BSS/HEPES (10 mM)	4 ml
	BSA	40 µl
<u>Medium B</u> :	Hanks´ BSS/HEPES (10 mM) FCS	117 ml 13 ml
Collagenase-Lösung:	Medium A	4 ml
	Collagenase v	0,004 g

Western-Blot:				
Proteingelladepuffer:	4x nicht-reduzieren	d (Roti <sup>®</sup> -Load 2, Roth)		
	3x reduzierend:			
	Tris	150 mM		
	EDTA	6 mM		
	SDS	3 %		
	β-ΜΕ	3 %		
	Glycerin	30 %		
	Bromphenolblau	0,01 %		
	pH 6,8; ad Aqua de	est.		
SDS-PAGE-Puffer:	Tris	3,02 g		
	Glycin	14,42 g		
	SDS (10 % w/v)	10 ml		
	ad Aqua dest. 1 I			
Blottingpuffer:	Tris	3,02 g		
	Glycin	14,42 g		
	Methanol	200 ml		
	ad Aqua dest. 1 I			
Blockingpuffer:	NaCl	100 mM		
	Tris	10 mM		
	Tween20	0,1 %		
	Milchpulver	5 %		
	pH 7,2; ad Aqua de	st.		
Waschpuffer:	NaCl	100 mM		
	Tris	10 mM		
	Tween20 0,1 %			
	pH 7,2; ad Aqua dest.			

Antikörperinkubationslösung:	NaCl	100 mM
	NaPO <sub>4</sub>	1 mM
	Tween20	0,2 %
	BSA	0,1 %
	pH 7,2; ad Aqua de	est.
Strippingpuffer:	Glycin	7,5 g
	NaCl	2,9 g
	pH 2,2, ad Aqua de	est. 500 ml
2.1.6 Marker		
Proteinmarker:	Precision plus prote	ein Bio-Rad
	standard dual color	
DNA-Marker:	100 bp-DNA-Leiter	Roth
	250 bp-DNA-Leiter	Roth

### 2.1.7 Oligonukleotide

### 2.1.7.1 Primer

Die im Verlauf der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden ausschließlich von der Firma Metabion bezogen (Tab. 2.2). Die Primergenerierung für Sequenzierungen oder für eine semi-quantitative RT-PCR fand mit Hilfe des online-erhältlichen Programms "Primer 3" statt. Für diese als auch für Klonierungs- und Mutageneseprimer wurde zur Gewährleistung der Sequenzspezifität eine Länge von mindestens 20 hybridisierenden Basen gewählt. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass zusammengehörige Primer eine annähernd gleiche Schmelztemperatur T<sub>m</sub> besitzen (ermittelt durch die Standardformel T<sub>m</sub> = [(G+C) x 4 + (A+T) x 2]) sowie einen ausgeglichenen Gehalt an G/C und A/T. Potentielle Haarnadelstrukturen, Dimerbildungen innerhalb der eigenen Primersequenz oder mit dem komplementären Primer sowie längere Poly(N)- oder G/C-Abschnitte sollten grundsätzlich vermieden werden. Primer für Mutagenesen wurden nach Anleitung des Mutagenese-Kit-Herstellers Finnzymes konstruiert und waren ebenso wie Klonierungsprimer in Abhängigkeit der Länge HPLC- oder OPC-gereinigt. <u>Tab. 2.2</u>: Zusammenstellung der verwendeten Primer. Angegeben sind jeweils Name, Verwendungszweck sowie die Nukleotidsequenz in  $5' \rightarrow 3'$  Richtung. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Basen, welche durch eine Mutagenese ausgetauscht werden sollten, sind fett formatiert. 5' bzw. F steht für "forward primer", 3' bzw. R für "reverse primer".

Name	Sequenz in 5' $\rightarrow$ 3' Richtung	Schnittstelle	Anwendung
5 <sup>-</sup> -GAPDH Rattus norvegicus	GGCATTGCTCTCAATGACA		sqRT-PCR, Sequenzierung
3´-GAPDH Rattus norvegicus	TGTGAGGGAGATGCTCAGT		sqRT-PCR
5´-OPG Rattus norvegicus	GAATGGTCACTGGGCTGTTT		sqRT-PCR, Sequenzierung
3´-OPG Rattus norvegicus	CCTCTTTCTCAGGGTGCTTG		sqRT-PCR
5´-RANK Rattus norvegicus	CAGCTTCTGGGGAGTCAGAG		sqRT-PCR, Sequenzierung
3´-RANK Rattus norvegicus	AAGGCAGTGTTTGGTGATCC		sqRT-PCR
5´-RANKL Rattus norvegicus	TCGGGTTCCCATAAAGTCAG		sqRT-PCR
3´-RANKL Rattus norvegicus	CTTGGGATTTTGATGCTGGT		sqRT-PCR
5´-TRAIL Rattus norvegicus	AIL GGATCACTCGGAGAAGCAAC		sqRT-PCR, Sequenzierung
3 <sup>2</sup> -TRAIL Rattus norvegicus	CTCCTGGATCACCAGCTCTC		sqRT-PCR
5 <sup>-</sup> -TRAIL-R2 Rattus norvegicus	-TRAIL-R2 TGCAAAGCTTGCATAGATGG		sqRT-PCR
3´-TRAIL-R2 Rattus norvegicus	GAGTCCATGGCAGGTAGGAA		sqRT-PCR, Sequenzierung
5´-ZNRF2 Rattus norvegicus	TTTAAGTGCCCGGTATGCTC		sqRT-PCR
3'-ZNRF2 TCTCCCTGCTGCAATTCTTC Rattus norvegicus			sqRT-PCR, Sequenzierung
5´-RIK Rattus norvegicus	5'-RIK GCCCCACCCTTACCTCTCTA		sqRT-PCR
3´-RIK Rattus norvegicus	3'-RIK attus norvegicus GCACCTGACTCCAGGAAGAG		sqRT-PCR, Sequenzierung
5´-COMMD7 Rattus norvegicus	IMD7         TCCAAATGGTGCATTGAAGA           rvegicus         TCCAAATGGTGCATTGAAGA		sqRT-PCR, Sequenzierung
3´-COMMD7 Rattus norvegicus	ACGTCACTCCAAACCTCCAC		sqRT-PCR
5 <sup>-</sup> ENY2 Rattus norvegicus	CTTAGGTGCCCGAGCTACTG		sqRT-PCR, Sequenzierung
3 <sup>2</sup> -ENY2 Rattus norvegicus	TTGCTAACCACCATCACCGC		sqRT-PCR
5'-TCF25 AGTCCATGGAGCCAAACAAC			sqRT-PCR, Sequenzierung

3 <sup>2</sup> -TCF25 Rattus norvegicus	GTGGAACACACACTCCATGC		sqRT-PCR
5 <sup>-</sup> SOCS1 Rattus norvegicus	CGCCAGAAGGAACTTTCTTGAT		sqRT-PCR
3 <sup>2</sup> -SOCS1 Rattus norvegicus	CCTGGAATTTATACTCTTCCAAG		sqRT-PCR
5 <sup>-</sup> SOCS2 Rattus norvegicus	CGGGAATTTGGAGAGAAACA		sqRT-PCR
3 <sup>2</sup> -SOCS2 Rattus norvegicus	CAGGGTCATGGGAGATGAGT		sqRT-PCR
5 <sup>-</sup> SOCS3 Rattus norvegicus	CCTTTGAGGTTCAGGAGCAG		sqRT-PCR
3´-SOCS3 Rattus norvegicus	CGTTGACAGTCTTCCGACAA		sqRT-PCR
5´-GAPDH Mus musculus	AACTTTGGCATTGTGGAAGG		sqRT-PCR
3 <sup>′</sup> -GAPDH Mus musculus	ACACATTGGGGGTAGGAACA		sqRT-PCR
5´-OPG Mus musculus	CTGCCTGGGAAGAAGATCAG		sqRT-PCR, Sequenzierung
<b>3´-OPG</b> Mus musculus	3 <sup>-</sup> OPG CAAGTGCTTGAGGGCATACA		sqRT-PCR
5 <sup>°</sup> -RANK Mus musculus	5'-RANK Mus musculus AAACCTTGGACCAACTGCAC		sqRT-PCR, Sequenzierung
3´-RANK Mus musculus	3'-RANK         TCATTGACCCAATTCCACAA           Mus musculus		sqRT-PCR
5´-RANKL Mus musculus	ACCAGCATCAAAATCCCAAG		sqRT-PCR
3´-RANKL Mus musculus	TCCATGCTAATGTTCCACGA		sqRT-PCR
5 <sup>-</sup> <b>TRAIL</b> GATGTTGGTGCCTGGAGTTT Mus musculus			sqRT-PCR, Sequenzierung
3´-TRAIL Mus musculus	<b>3'-TRAIL</b> AAGCAAAGGGCAGAAAGTCA		sqRT-PCR
5´-TRAIL-R2 Mus musculus	5´-TRAIL-R2 Mus musculus AATGGTCAAAGCCGAAACAC		sqRT-PCR, Sequenzierung
3´-TRAIL-R2 Mus musculus	3 <sup>-</sup> TRAIL-R2 AGGCTGACTTCAAACGCACT Mus musculus		sqRT-PCR
5´-ZNRF2 Mus musculus	<b><sup>7</sup>-ZNRF2</b> CACAGAACTCAGCGAACCAA		sqRT-PCR, Sequenzierung
3´-ZNRF2 Mus musculus	ААССССААССААСАААСААА		sqRT-PCR
5´-RIK Mus musculus	AAGAATGACCACCTCCATGC		sqRT-PCR, Sequenzierung
3´-RIK Mus musculus	CATGGCCTAGAGAGGTGAGG		sqRT-PCR
5'-COMMD7 Mus musculusTCTCTGGGAGGCAGTCTTGT			sqRT-PCR, Sequenzierung

3´-COMMD7 Mus musculus	CGTCTGGCCTCAGTTCTTTC		sqRT-PCR, Sequenzierung
5 <sup>°</sup> -ENY2 Mus musculus	GAACAAAGATGCGCAGATGA		sqRT-PCR, Sequenzierung
3 <sup>°</sup> -ENY2 Mus musculus	TTCAGCCACCAAGTCATCAA		sqRT-PCR, Sequenzierung
5´-TCF25 Mus musculus	CCTGATACAGCAGGCACTCA		sqRT-PCR, Sequenzierung
3´-TCF25 Mus musculus	TGACCTCCCCAGGTACAGAC		sqRT-PCR, Sequenzierung
5 <sup>°</sup> -SOCS1 Mus musculus	CTTAACCCGGTACTCCGTGA		sqRT-PCR
3´-SOCS1 Mus musculus	GAGGTCTCCAGCCAGAAGTG		sqRT-PCR
5 <sup>°</sup> -SOCS2 Mus musculus	TGGCTGCTCAAGATCAAATG		sqRT-PCR, Sequenzierung
3´-SOCS2 Mus musculus	TGTCCTCCTGGAAATGGAAG		sqRT-PCR, Sequenzierung
5´-SOCS3 Mus musculus	GCTGGCCAAAGAAATAACCA		sqRT-PCR
3´ <b>-SOCS3</b> Mus musculus	AGCTCACCAGCCTCATCTGT		sqRT-PCR
Sp6	Sp6 GATTTAGGTGACACTATAG		Sequenzierung
ТЗ	T3 ATTAACCCTCACTAAAGGGA		Sequenzierung
M13	GTAAAACGACGGCCAG		Sequenzierung
Τ7	TAATACGACTCACTATAGGG		Sequenzierung
SOCS2_F	SOCS2_F GGCCAT <u>GGATCC</u> ATCTCCCATGACCCTGCG BamHI		Klonierung
SOCS2_HA_R	SOCS2_HA_RTTTTGATATCAGGCGTAATCCGGGACATCGT ACGGGTACGGTAACCATACCTGGAATTTATA TTCTTCCEcoRV, BstEll		Klonierung
RIK_F	<b>RIK_F</b> TAAT <u>GGATCC</u> AGCCCAATGTCGGGCCCCAA <i>Bam</i> HI		Klonierung
RIK_R	RIK_RTTTTGATATCAGGCGTAATCCGGGACATCGT ACGGGTACGGTAACCAGGGGCTGGCATCGC CAGGEco Bst		Klonierung
COMMD7_F	MMD7_F TAAT <u>GGATCC</u> TGGCACCATGGGCCGCCT BamHI		Klonierung
COMMD7_R2	MD7_R2 GCTAAA <u>GGTAACC</u> AGCTGAGGCACTCCATG BstEll		Klonierung
ENY2_F	GGCCAT <u>GGATCC</u> GCGGTGATGGTGGTTAGC AAG	BamHI	Klonierung
ENY2_HA_R	ENY2_HA_R TTTT <u>GATATC</u> AGGCGTAATCCGGGACATCGT ACGGGTAC <u>GGTAACC</u> AAAGGCTGGCATGCT GAGC <i>Eco</i> RV, <i>Bst</i> Ell		Klonierung

TCF25_F	TAAT <u>GGATCC</u> GGTCCTATGTCGCGCCGG	Klonierung		
TCF25_R2_Bst	GCTAAA <u>GGTAACC</u> ACAGCTCTGTGGTGTAAT TT	<i>Bst</i> Ell	Klonierung	
OPG_F	GTACAT <u>CTCGAG</u> ACCACAATGAACAAGTGGC T	CACAATGAACAAGTGGC <i>Xho</i> l		
OPG_R	GGCCAT <u>CTCGAG</u> TTATAAGCAGCTTATTTTC ACG	CGAGTTATAAGCAGCTTATTTCCCCGCCCCCCCCCCCCC		
OPG_M_F	Phospho-ACAGAGCAGCTTC <b>T</b> TGCCTTGATG	spho-ACAGAGCAGCTTCTTGCCTTGATG		
OPG_M_R	Phospho-GGTGAGGTTCG <b>A</b> GTGGCCGAGAT			
<b>5´-OPG_stab</b> Mus musculus	CCCAGAAGAAATTGAGAGAACG		sqRT-PCR zum Nachweis stabiler Klone	
5´-TCF25_stab Mus musculus	'-TCF25_stab     CCTGATACAGCAGGCACTCA		sqRT-PCR zum Nachweis stabiler Klone	
5 <sup>°</sup> -SOCS2_stab Mus musculus	AGCATTTCTGTCGACTCGC		sqRT-PCR zum Nachweis stabiler Klone	

### 2.1.7.2 siRNA

Um Proteine zielgerichtet ausschalten zu können, wurden folgende in Tabelle 2.3 aufgeführte siRNA-Duplexe von der Firma Invitrogen konstruiert:

Tab. 2.3: Übersicht der getesteten siRNA-Sequenzen. Angegeben sind jeweils Name des posttranskriptionell zu inhibierenden Gens, Accessionsnummer der mRNA sowie Position, Name und Sequenz der siRNA.

Zielgen	Accessions- nummer	siRNA- Position	siRNA- Name	Sequenz
<b>SOCS2</b> (Rattus norvegicus)	NM_058208	449 - 467	siSOCS2-4	CCCACUCAGACUACCUAUU
<b>SOCS2</b> (Rattus norvegicus)	NM_058208	772 - 790	siSOCS2-7	CCAACAAGACUGAAAGAUU
<b>OPG</b> (Rattus norvegicus)	NM_012870	379 - 397	siOPG-3	CCGUGAAACAGGAGUGCAA
<b>OPG</b> (Rattus norvegicus)	NM_012870	838 - 856	siOPG-8	GCUCGCAAGAGCAAACUUU
<b>OPG</b> (Rattus norvegicus)	NM_012870	727 - 745	siOPG-65	GGUUUGCUGUGCCUACCAA
<b>OPG</b> (Rattus norvegicus)	NM_012870	1164 -1182	siOPG-66	GCAUACCACUUUCCCAAAA
<b>OPG</b> (Rattus norvegicus und Mus musculus)	NM_012870	613 - 631	siOPG-67	GCCUCCUGCUAAUUCAGAA

			siKontrolle = nonsense	AAUUGUUCGACUUUCUUGG
--	--	--	---------------------------	---------------------

### 2.1.8 Vektoren

Für eine zielgerichtete Proteinexpression im Rahmen dieser Arbeit kamen die in Tabelle 2.4 zusammengefassten Vektoren zum Einsatz. Auf die Konstruktion eigens hergestellter Plasmide wird in Abschnitt 3.2.2 näher eingegangen.

Tab. 2.4.: Übersicht der verwendeten Plasmide. Angegeben sind Name, Größe, Kurzbeschreibung und Referenz der jeweiligen Plasmide. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruierten Plasmide sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

Name	Größe	Beschreibung	Referenz	
pcDNA3	5.4 kb	Expressionsvektor mit einer MCS downstream des konstitutiven Eukaryontenpromotors P <sub>CMV</sub> ; Amp <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>	n /; Invitrogen	
pEGFP-N1	8.4 kb	Expressionsvektor mit Integration des N- terminalen Abschnitts der eGFP-Sequenz; Km <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>		
pCMV-SPORT6- RIK	4.7 kb	Plasmidvektor mit M13- und Sp6-Promotor sowie Integration der RIK-Sequenz (GenID: R2 73737; Mus musculus); Amp <sup>R</sup>		
pYX-Asc- Commd7	2.3 kb	Plasmidvektor mit T3- und T7-Promotor sowie Integration der COMMD7-Sequenz (GenID: 99311; Mus musculus); Amp <sup>R</sup>	RZPD	
pCMV-SPORT6- ENY2	4.7 kb	Plasmidvektor mit M13- und Sp6-Promotor sowie Integration der ENY2-Sequenz (GenID: 223527; Mus musculus); Amp <sup>R</sup>	RZPD	
pYX-Asc-TCF25	3.5 kb	Plasmidvektor mit T3- und T7-Promotor sowie Integration der TCF25-Sequenz (GenID: 66855; Mus musculus); Amp <sup>R</sup>		
pCMV-SPORT6- SOCS2	5.0 kb	Plasmidvektor mit M13- und Sp6-Promotor sowie Integration der SOCS2-Sequenz (GenID: 216233; Mus musculus); Amp <sup>R</sup>	: RZPD	
pCMV-SPORT6.1- OPG	5.6 kb	Plasmidvektor mit M13- und Sp6-Promotor sowie Integration der OPG-Sequenz (GenID: 18383; Mus musculus); Amp <sup>R</sup>	motor GenID: RZPD	
pMIP-GFP	13.8 kb	Expressionsvektor mit Integration der GFP- Gensequenz unter Kontrolle des konstitutiven Mausinsulinpromotors MIP; Amp <sup>R</sup>	er GFP- stitutiven p <sup>R</sup> A. Lechner, unveröffentlicht	
pcDNA3-RIK-HA	5,7 kb	pcDNA3 mit Integration der Fusion aus RIK-CDS (Mus musculus) und HA-Tag mit dazwischen lokalisierter B <i>stEII</i> -Schnittstelle unter Kontrolle des CMV-Promotors; Amp <sup>R</sup>	RIK-CDS wischen * Kontrolle	

pcDNA3-RIK	5,7 kb	pcDNA3-RIK-HA nach Deletion des HA-Tag über die <i>Bst</i> II- und <i>Eco</i> RV-Schnittstelle; Amp <sup>R</sup>	*	
pcDNA3- COMMD7-HA	6.1 kb	pcDNA3 mit Integration der COMMD7-CDS (Mus musculus) mit HA-Tag und dazwischen lokalisierter B <i>stEII</i> -Schnittstelle unter Kontrolle des CMV-Promotors; Amp <sup>R</sup>		
pcDNA3- COMMD7	6.0 kb	pcDNA3 mit Integration der COMMD7-CDS (Mus musculus) unter Kontrolle des CMV- Promotors; Amp <sup>R</sup>	*	
pcDNA3-ENY2- HA	5.8 kb	pcDNA3 mit Integration der ENY2-CDS (Mus musculus) mit HA-Tag und dazwischen lokalisierter B <i>stEII</i> -Schnittstelle unter Kontrolle des CMV-Promotors; Amp <sup>R</sup>	*	
pcDNA3-ENY2	5.7 kb	pcDNA3 mit Integration der ENY2-CDS (Mus musculus) unter Kontrolle des CMV-Promotors; Amp <sup>R</sup>	*	
pcDNA3-TCF25- HA	7.3 kb	pcDNA3 mit Integration der TCF25-CDS (Mus musculus) mit HA-Tag und dazwischen lokalisierter B <i>stEII</i> -Schnittstelle unter Kontrolle des CMV-Promotors; Amp <sup>R</sup>	*	
pcDNA3-TCF25	7.3 kb	pcDNA3 mit Integration der TCF25-CDS (Mus musculus) unter Kontrolle des CMV-Promotors; Amp <sup>R</sup>	*	
pcDNA3-SOCS2- HA	6.0 kb	pcDNA3 mit Integration der Fusion aus SOCS2- CDS (Mus musculus) und HA-Tag mit dazwischen lokalisierter BstEII-Schnittstelle unter Kontrolle des CMV-Promotors; Amp <sup>R</sup>	*	
pcDNA3-SOCS2	6.0 kb	pcDNA3-SOCS2-HA nach Deletion des HA-Tag über die <i>Bst</i> II- und <i>Eco</i> RV-Schnittstelle; Amp <sup>R</sup>	*	
pcDNA3-OPG	6.7 kb	pcDNA3 mit Integration der OPG-CDS (Mus musculus) unter Kontrolle des CMV-Promotors; Amp <sup>R</sup>	*	
pcDNA3-MIP-OPG	15.0 kb	b pcDNA3 mit Integration der OPG-CDS (Mus musculus) unter Kontrolle des MIP-Promotors; Amp <sup>R</sup>		
pcDNA3.1-SOCS3	6.1 kb	pcDNA3 mit Integration der SOCS3-CDS (GenID: 12702; Mus musculus) unter Kontrolle des CMV-Promotors; Amp <sup>R</sup>	AG Auernhammer; Medizinische Klinik II, Großhadern	

# 2.1.9 Antikörper

# 2.1.9.1 Primäre Antikörper

# Western-Blot:

anti-α-HA (mouse, monoklonal)	Cell Signaling
anti-β-Aktin (mouse, monoklonal)	Sigma-Aldrich
anti-JNK (rabbit, polyklonal)	Cell Signaling

anti-OPG (goat, polyklonal)	R&D-Syst
anti-Phospho-JNK (mouse, monoklonal)	Cell Signa
anti-p38 MAPK (rabbit, polyklonal)	Cell Signa
anti-Phospho-p38 MAPK (rabbit, polyklonal)	Cell Signa
anti-p44/42 MAPK (rabbit, polyklonal)	Cell Signa
anti-Phospho-p44/42 MAPK (rabbit, polyklonal)	Cell Signa
anti-Phospho-STAT5A/B (mouse, monoklonal)	Millipore
anti-STAT5A/B (rabbit, polyklonal)	Santa Cru
anti-SOCS2 (rabbit, polyklonal)	Abcam
anti-SOCS3 (rabbit, polyklonal)	Abcam

### Immunfluoreszenz/Immunhistochemie:

anti-BrdU (mouse, monoklonal) Sigma-Aldrich anti-Glukagon (guinea pig, polyklonal) Linco anti-Insulin (guinea pig, polyklonal) anti-OPG (rat, polyklonal) **R&D-Systems** 

#### 2.1.9.2 Sekundäre Antikörper

### Western-Blot:

anti-mouse-IgG, HRP-gekoppelt (goat) anti-rabbit-IgG, HRP-gekoppelt (goat) anti-goat-IgG, HRP-gekoppelt (donkey)

### Immunfluoreszenz/Immunhistochemie:

anti-mouse-Cy3 (donkey) anti-guinea pig-Cy2 (donkey) anti-rat-Cy3 (donkey) biotinyliertes anti-guinea pig-IgG (goat)

tems aling aling aling aling aling JZ

Dako Cytomation

Jackson Immunoresearch Jackson Immunoresearch Jackson Immunoresearch

Jackson Immunoresearch Jackson Immunoresearch Jackson Immunoresearch Vector Laboratories

# 2.1.10 Enzyme

BamHI	New England Biolabs
BstEll	New England Biolabs
Calf intestinal Alkaline Phosphatase	Invitrogen
EcoRV	New England Biolabs
HindIII	New England Biolabs
Mung Bean Nuclease	New England Biolabs
Nrul	New England Biolabs
Pfx50 <sup>™</sup> DNA-Polymerase	Invitrogen
Phusion Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes
Quick T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
Reverse Transkriptase	Promega
Taq DNA-Polymerase	Qiagen
Xhol	New England Biolabs

# 2.1.11 Zytokine

Bei allen verwendeten Zytokinen handelt es sich um rekombinante, in *Escherichia coli* exprimierte Proteine, die nach Angaben der Hersteller gelöst und aliquotiert wurden.

Growth hormone (human)	R&D-Systems
Interferon-γ (mouse)	Calbiochem
Interleukin-1β (mouse)	Calbiochem
M-CSF (mouse)	Sigma-Aldrich
Prolaktin (mouse)	R&D-Systems
Osteoprotegerin (mouse)	R&D-Systems
TRAIL (mouse)	R&D-Systems
RANKL (mouse)	R&D-Systems
Tumornekrosefaktor-α (mouse)	R&D-Systems

# 2.1.12 Medien und Medienzusätze

Für die Kultivierung eukaryotischer Zellen wurden folgende Medien und Medienzusätze verwendet, welche bereits steril vom Hersteller bezogen wurden:

DMEM (4,5 g/l Glukose, + Na-Pyruvat, + L-Glutamin)	PAA
DMEM/F12	Gibco
Fötales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	PAA
Hanks`BSS (1x; +Ca, +Mg, -Phenol Red)	PAA
HEPES (1 M, pH 7,4)	PAA
MEMα Modification (+ L-Glutamin, - Ribonukleoside)	PAA
Natrium-Pyruvat (100 mM)	PAA
Penicillin/Streptomycin (100x Konzentrat)	PAA
RPMI 1640 (+ L-Glutamin, + Phenolrot)	PAA
RPMI 1640 (+ L-Glutamin, - Phenolrot)	PAA
RPMI 1640 (+ L-Glutamin, + Phenolrot, - Glukose)	Invitrogen

Die Kultivierung prokaryotischer Zellen erfolgte in SOC-Medium (steril, von Invitrogen), in LB-Medium (Roth) oder auf LB-Agar-Platten (Roth). Die beiden Letzteren wurden nach Angaben des Herstellers in destilliertem Wasser resuspendiert, anschließend autoklaviert (121°C, 20 min, 1 bar Überdruck) und nach kurzem Abkühlen mit einem geeigneten Antibiotikum versetzt.

# 2.1.13 Bakterienstämme

Für Klonierungszwecke wurden folgende, bereits kompetente *E. coli*-DH5α-Stämme von der Firma Invitrogen bezogen:

- Subcloning Efficiency<sup>™</sup> DH5α<sup>™</sup> Competent Cells (Transformation von Plasmid-DNA < 10 kb)</li>
- Max Efficiency<sup>®</sup> DH5α<sup>™</sup> T1 Phage-Resistant Competent Cells (Transformation von Plasmid-DNA > 10 kb)

# 2.1.14 Eukaryotische Zelllinien

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zelllinien sind in Tabelle 2.5 aufgeführt und wachsen adhärent.

<u>Tab. 2.5.</u>: Übersicht der eukaryotischen Zelllinien. Angegeben sind Name, Kurzbeschreibung, Wachstumsmedium und Herkunft der Zelllinien.

Name	Beschreibung	Kulturmedium	Bezugsquelle
AAV293 (HEK293- Derivat)	humanes, embryonales Nierenepithel	DMEM (mit 25 mM Glukose, 110 µg/ml Na-Pyruvat, 2 mM Glutamin) versetzt mit 10 % FCS, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin	AG Brödl, Medizinische Klinik II, Großhadern
BON1	humanes, pankreatisches Karzinoid	DMEM/F12 versetzt mit 5 % FCS, 100 IU/mI Penicillin, 100 µg/mI Strepto- mycin	AG Auernhammer, Medizinische Klinik II, Großhadern
HeLa	humanes Zervixkarzinom	RPMI versetzt mit 10 % FCS, 10 mM HEPES, 100 IU/mI Penicillin, 100 µg/mI Streptomycin	AG Spitzweg, Medizinische Klinik II, Großhadern
HepG2	humanes Hepatom	DMEM/F12 versetzt mit 10 % FCS, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin	AG Spitzweg, Medizinische Klinik II, Großhadern
Ins-1E	Ratteninsulinom	RPMI versetzt mit 5 % FCS, 10 mM HEPES, 1 mM Na-Pyruvat,100 IU/mI Penicillin, 100 μg/mI Streptomycin, 50 μM β-ME	C. Wollheim, Universität Genf, Schweiz
LNCaP	humanes Prostatakarzinom	RPMI versetzt mit 10 % FCS, 100 IU/mI Penicillin, 100 µg/mI Strepto- mycin	AG Brand, Medizinische Klinik II, Großhadern
MCF-7	humanes Mammakarzinom	DMEM/F12 mit 10 % FCS, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin	AG Spitzweg, Medizinische Klinik II, Großhadern
MIN6	Mausinsulinom	DMEM (mit 25 mM Glukose, 110 μg/ml Na-Pyruvat, Glutamin) versetzt mit 15 % FCS, 100 IU/ml Penicillin, 100 μg/ml Streptomycin, 71 μM β-ME	Irminger JC, Universität Genf

### 2.1.15 Mausstämme

Die Haltung der Tiere erfolgte in einem ausschließlich für Nager genutzten Tierstall unter konstanten Bedingungen mit einem 12-stündigen Tag-/Nachtrhythmus, einer adäquaten Raumtemperatur und einem freien Zugang zu Standardfutter und Wasser. Sie entsprach ebenso wie die Durchführung der behördlich genehmigten Tierversuche den gesetzlichen Richtlinien. Für *in vivo*-Versuche sowie für die Präparation von Pankreasgewebe bzw. von Pankreasinseln kamen sowohl männliche als auch weibliche Mäuse folgender Stämme zum Einsatz:

C57BL/6J	Charles River
SOCS2 <sup>-/-</sup>	Walter and Eliza Hall Institute of Medical
	Research, Victoria, Australien (Metcalf et al., 2000)
B6.Cg-m +/+ Lepr <sup>db</sup> /J	Jackson Laboratories (Stock number: 000697)
BKS.Cg-m +/+ Lepr <sup>db</sup> /J	Jackson Laboratories (Stock number: 000642)

SOCS2-Knockout-Mäuse (mit C57BL/6J-Hintergrund) und db/+-Mäuse wurden nach Erhalt geeigneter Zuchtpaare und Bestehen eines notwendigen Gesundheitschecks im hausinternen Zuchtstall weitergezüchtet. Aufgrund der Fertilität der SOCS2-Knockout-Tiere konnte eine homozygote Paarung der Tiere stattfinden, so dass keine Genotypisierung der Nachkommen erforderlich war. Für die Zucht von Mäusen mit einem Defekt in beiden Leptinrezeptor-Allelen (= Lepr<sup>db</sup>/Lepr<sup>db</sup>, in dieser Arbeit in <u>db/db B6</u> und <u>db/db BKS</u> differenziert) wurden aufgrund deren Sterilität ausschließlich heterozygote db/+ B6- bzw. db/+ BKS-Mäuse verwendet, welche auch als Kontrolltiere dienten. Anhand ihres schwarzen Felles konnten db/db-Mäuse bereits kurz nach Geburt von ihren grauen, nicht verwendeten +/+-Geschwistern unterschieden und getrennt werden. Nach drei bis vier Wochen entwickelten db/db-Mäuse eine Adipositas und konnten ab diesem Zeitpunkt aufgrund dessen auch von ihren ebenfalls schwarzfelligen, jedoch schlanken, heterozygoten Geschwistern (db/+) unterschieden werden. Eine Genotypisierung war deshalb auch hier nicht notwendig.

# 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Klonierung

### 2.2.1.1 DNA-Amplifizierung mittels PCR

Zur Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten wurde die sogenannte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Hierfür wurde das "Taq PCR Core Kit" bzw. das "Pfx50<sup>TM</sup> DNA-Polymerase Kit" der Firma Invitrogen verwendet. Da die Pfx50 DNA-Polymerase eine 3´  $\rightarrow$  5´-Exonuklease-Proofreading-Aktivität aufweist und sie sich mit einer fünfzigfach größeren Genauigkeit gegenüber der Taq-Polymerase auszeichnet, wurde sie zur Amplifikation von DNA-Fragmenten bei Klonierungen eingesetzt. Die Taq-Polymerase hingegen wurde für Kolonie-PCRs (s. Abschnitt 2.2.1.9) und semi-quantitative Real-Time-PCRs (sqRT-PCR; s. Abschnitt 2.2.2) verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich üblicherweise folgendermaßen zusammen:

 ca. 100 ng plasmidäre DNA bzw. 0,1 - 2 μl cDNA

 PCR-Puffer (10x)
 5 μl

 dNTPs (10 mM)
 1 μl

 5'-Primer (100 pmol/μl)
 2,5 μl

 3'-Primer (100 pmol/μl)
 2,5 μl

 DNA-Polymerase (5 U/μl)
 0,5 μl

 ad 50 μl mit Aqua dest.

Das PCR-Reaktionsgefäß wurde nach Zusammenpipettieren des oben aufgeführten Reaktionsansatzes in den PxE Thermocycler von Thermo Scientific gestellt. Eine Überschichtung des PCR-Ansatzes mit Mineralöl war aufgrund der Hotlid-Funktion des Thermocyclers nicht notwendig. Das PCR-Programm umfasste je eine 3minütige Phase bei 94°C zur Denaturierung der Template-DNA, gefolgt von 20 bis 35 Polymerisationszyklen, deren Reaktionsbedingungen in Abhängigkeit der gewählten Primer, der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes sowie der Aktivität der DNA-Polymerase variierten. Jeder dieser Zyklen umfasste eine Denaturierung bei 94°C (30 sec bis 60 sec), eine Hybridisierung der beiden Primer bei 55°C bis 62°C (30 sec bis 60 sec) sowie eine Polymerisation bei 72°C (30 sec bis 3 min). Eine 10minütige Inkubation bei 72°C zur Vollendung angefangener Polymerisationen schloss das PCR-Programm ab.

#### 2.2.1.2 Spezifische enzymatische Hydrolyse von DNA

Für die enzymatische Hydrolyse der DNA wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet, welche die Fähigkeit besitzen spezifische Nukleotidsequenzen zu erkennen und diese dort zu spalten (Arber, 1978). Dafür notwendige Reaktionsbedingungen wurden nach Empfehlungen des Herstellers gewählt. Konnte die gleichzeitige DNA-Hydrolyse mit mehreren Enzymen aufgrund deren unterschiedlicher Pufferansprüche nicht gewährleistet werden, wurden die einzelnen Restriktionsschritte nacheinander durchgeführt. Zwischen den einzelnen Reaktionen fand jeweils eine Reinigung der DNA statt (s. Abschnitt 2.2.1.4). Resultierten aus der Hydrolyse zwei verschiedener Restriktionsenzyme am selben Nukleotid sowohl glatte als auch kohäsive Enden, so wurde vor einer Religation des linearisierten DNA-Moleküls das kohäsive Ende durch die sogenannte "Mung Bean Nuclease" entfernt.

### 2.2.1.3 DNA-Gelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten fand durch Elektrophorese in Agarosegelen statt. Abhängig von der Länge der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde hierfür Agarose in einer Konzentration von 0,7 %, 1,0 %, 1,5 % bzw. 2,0 % (w/v) in TAE-Puffer unter Benutzung eines Mikrowellenherdes verflüssigt und anschließend in eine Flachbettapparatur gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde dieses vollständig mit TAE-Puffer überschichtet. Dann folgte das Beladen der Geltaschen mit einem geeigneten DNA-Längenstandard (s. Abschnitt 2.1.6) sowie den DNA-Proben, welche vorher mit 1/6 Vol. eines Gelladepuffers der Firma Roth vermischt wurden. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente fand bei einer Spannung von 100 bis 130 Volt statt. Nach Beendigung der Elektrophorese folgte die 10- bis 20-minütige Färbung des Agarosegels in einer Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) sowie ein anschließendes Auswaschen überflüssigen Farbstoffes in VE-Wasser für ebenfalls 10 bis 20 min. Die aufgetrennten DNA-Fragmente konnten nun unter UV-Bestrahlung (UVP Inc.: UV Transilluminator) sichtbar gemacht werden.

### 2.2.1.4 Reinigung von DNA und DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Reinigung von DNA-Fragmenten ab einer Länge von ca. 100 bp erfolgte mit Hilfe des "Qiaquick PCR-Purification Kits" der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Hydrolysierte DNA-Fragmente und PCR-Produkte, die im Agarosegel mindestens eine zusätzliche DNA-Bande im Agarosegel zeigten, wurden mit Hilfe des "Qiaquick Gel Extraction Kits" (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel extrahiert und dadurch gleichzeitig von zusätzlichen Substanzen wie Enzymen, NTPs u.a. gereinigt. Die gereinigte DNA wurde schließlich in Abhängigkeit ihrer Menge in 30 µl bzw. 50 µl destilliertem Wasser gelöst.

### 2.2.1.5 Dephosphorylierung linearisierter DNA

Um nach enzymatischer Spaltung der DNA eine Rezirkulation zu vermeiden, wurde die Phosphatgruppe am 5'-Ende des DNA-Moleküls unter Verwendung der alkalischen Phosphatase (aus Kälberdarm; 1 U/µI) entfernt. Diese Reaktion fand jedoch nur bei Insertion eines zu klonierenden DNA-Fragmentes statt.

### 2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde das "Quick Ligation Kit" der Firma New England Biolabs nach den empfohlenen Richtlinien des Herstellers angewandt. Mit diesem Kit war die Ligation sowohl glatter als auch kohäsiver Enden möglich.

### 2.2.1.7 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Die Transformation von *E. coli*-Zellen basierte auf der Standardmethode nach Cohen *et al.* und wurde nach Angaben der Firma Invitrogen durchgeführt (Cohen *et al.*, 1972). Da in der Regel Plasmide kleiner als 10 kb transformiert wurden, kamen fast ausschließlich Subcloning Efficiency<sup>TM</sup> DH5 $\alpha$ -Zellen zum Einsatz. Dafür wurde ein Aliquot von 30 µl kompetenten *E. coli*-Zellen mit 1 bis 5 µl (1 bis 10 ng) DNA (= Ligationsansatz; s. Abschnitt 2.2.1.6) versetzt, 30 min in Eis gestellt und anschließend einem 20-sekündigen Hitzeimpuls bei 42°C ausgesetzt. Danach wurden die Zellen weitere 2 min in Eis inkubiert und anschließend mit 1 ml SOC-Medium versetzt. Um die Expression plasmidkodierter Antibiotikaresistenzen zu ermöglichen, wurden die Zellen 1 h bei 37°C geschüttelt. Durch 3-minütige Zentrifugation bei 6.000 rpm wurden die Zellen Restvolumen resuspendiert und anschließend auf entsprechend geeigneten LB-Selektivplatten mit einem Drigalskispatel ausplattiert.

### 2.2.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen sowie im mittleren Maßstab erfolgte unter Anwendung des "Quicklyse Miniprep Kit" (Qiagen) bzw. des "Qiafilter Plasmid Midi Kit" (Qiagen) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 2.2.1.9 Kolonie-PCR

Die Methode der Kolonie-PCR wurde angewandt, um die Präsenz eines bestimmten DNA-Fragmentes in einem *E. coli*-Klon nachzuweisen. Dazu wurde eine Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocher direkt von einer LB-Platte in ein PCR-Reaktionsgefäß transferiert. Dieses beinhaltete bereits folgenden Reaktionsansatz:

PCR-Puffer (10x)	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	1,5 µl
5'-Primer (100 pmol/µl)	0,05 µl
3'-Primer (100 pmol/µl)	0,05 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
ad 15 µl mit Aqua dest.	

Dabei wurde mindestens ein Primer so gewählt, dass er innerhalb des nachzuweisenden Fragmentes hybridisierte. Um das Pipettieren der geringen Mengen an Komponenten zu vereinfachen, wurde zunächst ein Mastermix hergestellt, welcher die vielfache Menge des Reaktionsansatzes enthielt und entsprechend auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt wurde. Während des ersten Reaktionsschrittes der PCR bei 94°C fand die Lyse der Zellen statt, so dass deren DNA freigesetzt und mittels der PCR amplifiziert werden konnte (s. Abschnitt 2.2.1.1). Nach Beendigung der PCR konnte nun mit Hilfe einer Agarosegel-Elektrophorese das Vorhandensein des bestimmten DNA-Fragmentes überprüft werden.

### 2.2.1.10 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Quantifizierung von DNA erfolgte mit Hilfe des "Quant-iT<sup>™</sup> dsDNA HS Assay Kits" (Messbereich 0,2 bis 100 ng) bzw. des "Quant-iT<sup>™</sup> dsDNA BR Assay Kits" (Messbereich 2 bis 1000 ng) und dem dazugehörigen Fluorometer nach Angaben des Herstellers Invitrogen.

#### 2.2.1.11 Sequenzierung von DNA

Um das Vorhandensein bestimmter Gene nachzuweisen und um sicherzustellen, dass klonierte bzw. mutierte DNA-Sequenzen vollständig und korrekt sind, wurden entsprechende DNA-Nukleotide in Form von PCR-Amplifikaten oder isolierter Plasmid-DNA mit geeigneten Primern sequenziert. Die Sequenzierungen wurden ausschließlich von der Firma Medigenomix vorgenommen.

#### 2.2.1.12 DNA-Mutagenese

Um zielgerichtet eine oder mehrere missense-Mutationen in der Plasmid-DNA zu entfernen, wurde das auf dem Prinzip der PCR basierende "Phusion Hot Start High Fidelity DNA-Polymerase Kit" der Firma Finnzymes nach deren Vorgaben verwendet. Der als Template für die Mutagenese fungierende Vektor wurde im Rahmen der Mutagenese vollständig neu synthetisiert.

#### 2.2.1.13 Anlegen von Glycerin-Dauerkulturen

Von dem zu konservierenden Bakterienstamm wurden 750 µl ÜNK mit 150 µl steriler 30 %-iger Glycerinlösung versetzt. Diese Suspension wurde unter gelegentlichem Invertieren für ca. 2 h bei RT belassen, anschließend 1 h bei 4°C inkubiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

#### 2.2.1.14 Konstruktion von Vektoren

Um *in vitro* die physiologische Rolle verschiedener Proteine testen zu können, wurden entsprechende Überexpressionsvektoren konstruiert. Die Herstellung der zu klonierenden DNA-Fragmente erfolgte mittels PCR. Dafür wurden das Template und die Primer so gewählt, dass das PCR-Produkt die komplette kodierende Sequenz (CDS) des zu klonierenden Gens inklusive einiger Basen der Kozaksequenz "upstream" des Startcodons enthielt. Um sicherzustellen, dass jeweils die als Template fungierenden Vektoren die vollständige CDS besitzen, fand eine vorherige Sequenzierung der Templates mit geeigneten Primern (T3 und T7 bzw. M13 und Sp6) statt. Jedes Amplifikat wurde durch die spezielle Primerwahl an beiden Enden von einer bestimmten Restriktionsschnittstelle flankiert. Anschließend erfolgten die Hydrolyse des hergestellten Inserts und des jeweiligen Ausgangsvektors mit den-

selben Restriktionsendonukleasen sowie eine Reinigung der gewünschten DNA-Fragmente mit Hilfe kommerziell erhältlicher Kits (s. Abschnitt 2.2.1.4). Das Ausgangsplasmid wurde gegebenenfalls im direkten Anschluss an die Hydrolyse zusätzlich am 5'-Ende durch eine alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Entstanden durch doppelenzymatischen Verdau eines zu religierenden Vektors ein kohäsives und ein glattes Ende, so wurde der DNA-Überhang des kohäsiven Endes unmittelbar nach Hydrolyse mit Hilfe der "Mung Bean Nuclease" (New England Biolabs) entfernt. Die Religation eines Vektors erfolgte ebenso wie die Ligation eines zu integrierenden DNA-Fragments in einen Ausgangsvektor unter Anwendung des "Quick Ligation Kits" der Firma New England Biolabs. Nach Transformation der ligierten DNA-Moleküle in kompetente E. coli-Zellen wurden diese zur Selektion auf LB-Selektivplatten ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert. Ob die jeweilige Klonierung funktioniert hat, konnte durch unterschiedliche Anwendungen überprüft werden. Dies geschah entweder durch Kolonie-PCR entsprechend transfizierter E. coli-Zellen, anhand der Größe der im Agarosegel detektierten Mini-Plasmid-DNA oder durch Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab mit anschließendem Verdau unter Verwendung geeigneter Restriktionsendonukleasen. Von positiven Klonen wurde letztendlich die Plasmid-DNA im mittleren Maßstab isoliert und zusammen mit geeigneten Primern für eine Sequenzierung verwendet. Konnten dadurch Korrektheit der Nukleotidabfolge sowie Vollständigkeit der entscheidenden Regionen des neu konstruierten Plasmids nachgewiesen werden, wurde vom entsprechenden Klon eine Glycerin-Dauerkultur hergestellt (s. Abschnitt 2.2.1.13).

Als Basisvektor für alle hergestellten Plasmide diente der in Abbildung 2.1 am Beispiel der Konstruktion des Vektors pcDNA3-SOCS2 dargestellte Expressionsvektor pcDNA3.1 (Invitrogen). Dieser enthält als Selektionsmarker eine Ampicillinsowie eine Neomycinkassette und besitzt einen in der Vektormap nicht gezeigten "ori" für die Replikation in Prokaryonten. Die zu klonierenden Sequenzen wurden unmittelbar "downstream" des Eukaryontenpromotors (CMV) in die "multiple cloning site" (MCP) des pcDNA3.1 kloniert.

50



<u>Abb. 2.1</u>: Konstruktion der Überexpressionsvektoren am Beispiel des Proteins SOCS2. Das zu klonierende DNA-Fragment wurde mittels einer PCR generiert und besteht aus der kompletten CDS des SOCS2-Gens, welches mit einer *Bst*EII-Schnittstelle und einem HA-Tag fusioniert ist (A). Nach der Hydrolyse sowohl des Vektors pcDNA3.1 als auch des Inserts mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Eco*RV (B) erfolgte die Ligation des Inserts unmittelbar stromabwärts des CMV-Promotors in die MCS von pcDNA3.1 (C). Von dem so entstandenen Vektor pcDNA3-SOCS2-HA wurde durch *Bst*EII/*Eco*RV-Verdau und anschließender Entfernung des daraus resultierenden kohäsiven Endes durch die "Mung Bean Nuclease" (MBN) der HA-Tag deletiert (D). Aus der folgenden Religation resultierte der Überexpressionsvektor pcDNA3-SOCS2 (E). In den Vektormaps sind der Promotor CMV (grüner Pfeil), die CDS des zu klonierenden Gens SOCS2 (violetter Pfeil), der HA-Tag (brauner Pfeil), die Selektionsmarker Amp und Neo (blaue Pfeile), das BGH-polyA (= "bovine growth hormone" Polyadenylierungssignal; gelber Rahmen) sowie einige Restriktionsschnittstellen dargestellt.

Um die Möglichkeit einer alternativen Proteindetektion offenzuhalten (für einige gewählte Kandidatenproteine existierten noch keine geeigneten Antikörper), wurde jeweils für die Proteine RIK, COMMD7, ENY2, TCF25 und SOCS2 zunächst ein Überexpressionsvektor mit HA-(Hemagglutinin)-Tag hergestellt. Dieser beinhaltete eine Fusion aus der CDS des jeweiligen Gens ohne Stopcodon, einer carboxy-terminal gelegenen *Bst*EII-Schnittstelle sowie der unmittelbar daran anschließenden

Sequenz des HA-Tags mit Stopcodon. Die fusionierte Sequenz bildete somit einen offenen Leserahmen. Der HA-Tag wurde durch einen Doppelverdau des Vektors mit den Restriktionsendonukleasen *Bst*EII und *Eco*RV deletiert. Nach Verdau des 5´-Überhangs des daraus entstandenen kohäsiven Ende durch die Exonukleaseaktivität der "Mung Bean Nuclease" (MBN) und die anschließende Religation des Vektors resultierte ein tagfreier Überexpressionsvektor mit einer kompletten CDS (inkl. Stopcodon).

In Tabelle 2.6 sind die für die Konstruktion der verschiedenen Vektoren notwendigen Templates, Primer, Ausgangsvektoren und Restriktionsendonukleasen zusammengefasst.

<u>Tab. 2.6</u>: Übersicht über die Konstruktion der Überexpressionsvektoren. Angegeben sind die zur Herstellung der zu klonierenden DNA-Fragmente (= Insert) notwendigen Templates, die Primer der PCR, die zur Hydrolyse der Inserts bzw. der Ausgangsvektoren benötigten Restriktionsendonukleasen sowie die aus der (Re-)ligation resultierenden Vektoren. Wenn keine PCR angegeben ist, wurde der HA-Tag durch enzymatischen Verdau des Ausgangsvektors deletiert und der Vektor anschließend religiert. MBN = Mung Bean Nuclease.

Template	Primer	Insert	Ausgangs- vektor	Restriktions- endonukleasen	Resultierender Vektor
pCMV-SPORT6- RIK	RIK_F RIK_R	RIK-HA (312 bp)	pcDNA3	<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RV	pcDNA3-RIK-HA
pCMV-SPORT6- ENY2	ENY2_F ENY2_HA_R	ENY2-HA (368 bp)	pcDNA3	<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RV	pcDNA3-ENY2-HA
pCMV-SPORT6- SOCS2	SOCS2_F SOCS2_HA_R	SOCS2-HA (660 bp)	pcDNA3	<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RV	pcDNA3-SOCS2- HA
pYX-Asc- COMMD7	COMMD7_F COMMD7_R2	COMMD7 (631 bp)	pcDNA3-HA	BamHI, BstEⅡ	pcDNA3- COMMD7-HA
pYX-Asc-TCF25	TCF25_F TCF25_R2 Bst	TCF25 (1905 bp)	pcDNA3-HA	BamHI <i>, Bst</i> EII	pcDNA3-TCF25- HA
			pcDNA3-RIK- HA	<i>Bst</i> EⅡ, <i>Eco</i> RV, MBN	pcDNA3-RIK
			pcDNA3- ENY2-HA	<i>Bst</i> EII, <i>Eco</i> RV, MBN	pcDNA3-ENY2
			pcDNA3- SOCS2-HA	<i>Bst</i> EII, <i>Eco</i> RV, MBN	pcDNA3-SOCS2
			pcDNA3- COMMD7-HA	<i>Bst</i> EII, <i>Eco</i> RV, MBN	pcDNA3-COMMD7

			pcDNA3- TCF25-HA	<i>Bst</i> EII, <i>Eco</i> RV, MBN	pcDNA3-TCF25
pCMV- SPORT6.1-OPG	OPG_F OPG_R	OPG (1236 bp)	pcDNA3	Xhol	pcDNA3-OPG
pMIP-GFP		MIP	pcDNA3-OPG	HindIII, Xhol	pcDNA3-MIP-OPG

### 2.2.2 Semi-quantitative RT-PCR

### 2.2.2.1 Isolation und Quantifizierung von Gesamt-RNA

Zum Nachweis der Transkription bestimmter Gene in Mauspankreasinseln oder Tumorzellen durch die Methode der semi-quantitativen RT-PCR wurde zunächst aus den entsprechenden Proben die gesamte Ribonukleinsäure (RNA) isoliert. Dies geschah unter Verwendung des "RNeasy Plus Mini Kits" der Firma Qiagen.

Für die RNA-Isolation von Inseln wurden diese direkt nach Isolation mit einer "ausgezogenen" Glaspipette komplett von Medienresten befreit und sofort in 350 µl RLT-Puffer (gehört zu Kit) gelöst. Die weiteren Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers.

Sollte von adhärenten Tumorzellen RNA isoliert werden, so wurden diese in 24-Well-Platten zu den gewünschten Konditionen (Zellzahl, Stimulanzien, Inkubationsdauer) inkubiert, einmal mit PBS gewaschen und in 200  $\mu$ l 37°C-warmer Trypsin/EDTA-Lösung für wenige Minuten trypsiniert. Nach Abstoppen der Trypsinierung durch Zugabe von 800  $\mu$ l des entsprechenden Mediums mit 10 % Serum, wurde die Zellsuspension in ein RNA-freies 1,5 ml-Eppendorfgefäß pipettiert und für 5 min bei 300 x g (4°C) zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen (5 min, 300 x g, 4°C) und in 350  $\mu$ l RLT-Puffer gelöst. Die weiteren Schritte zur RNA-Isolation wurden auch hier nach Angaben des kitspezifischen Protokolls durchgeführt.

Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde unter Anwendung des "Quant-iT<sup>™</sup> RNA Assay Kits" im dazu benötigten Fluorometer der Firma Invitrogen ermittelt.

### 2.2.2.2 Reverse Transkription

Die isolierte RNA wurde durch das Enzym Reverse Transkriptase des "ImProm-II<sup>™</sup> Reverse Transcription Systems" (Promega) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Da mit diesem Kit maximal 1 µg RNA bzw. 4 µl RNA-Lösung eingesetzt werden konnten und die erhaltenen RNA-Konzentrationen oft gering waren, wurde meist die maximal zulässige RNA-Menge verwendet. Für einen quantitativen Expressionsvergleich wurden gleiche RNA-Konzentrationen für die Umschreibung benutzt. Als Primer diente in allen Reaktionen der dem Kit zugehörige Oligo(dT)-Primer.

### 2.2.2.3 Semi-quantitative RT-PCR

Die umgeschriebene cDNA diente, wie im Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben, als Template für die semi-quantitative RT-PCR. Sollte die Expression bestimmter Gene quantitativ verglichen werden, wurden die cDNA-Proben zunächst mit Primern der ubiquitär in hohen Mengen exprimierten GAPDH amplifiziert. Die dafür gewählte Anzahl an Zyklen lag zwischen 20 und 24, um die eingesetzte cDNA-Menge der jeweiligen Proben am effektivsten aufeinander abgleichen zu können. Zeigten alle GAPDH-Banden nach Detektion im Agarosegel die gleiche Intensität im UV-Licht, wurde die semi-quantitative RT-PCR mit denselben cDNA-Mengen und den gewünschten Primern durchgeführt.

# 2.3 Zellbiologische Methoden

# 2.3.1 Kultivierung prokaryontischer Zellen

Generell wurden in dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme unter sterilen Bedingungen behandelt und kultiviert. Für die Anzucht von Bakterien für Plasmidisolationen wurden 3 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) mit einer einzelnen Bakterienkolonie einer frisch ausgestrichenen LB-Agarplatte angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (ca. 250 rpm) inkubiert. Bei Plasmidisolationen im kleinen Maßstab betrug die Inkubationsdauer 12 bis 16 h (Mini). Sollte eine größere Plasmidmenge isoliert werden (Midi), so folgte nach 8 h Inkubation eine 1000-fache Verdünnung der Bakteriensuspension in 50 ml LB-Selektivmedium und eine zusätzliche Inkubation von 12 bis 16 h im Bakterienschüttler (37°C, 250 rpm). Nach einer Transformation sowie für die Rekultivierung von Bakterien aus einer Glycerindauerkultur wurden die Bakterien mit einem Drigalskispatel bzw. einer Impföse auf selektiven LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Kultivierung von LB-Platten erfolgte ebenfalls bei 37°C im Bakterieninkubator.

## 2.3.2 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Alle Arbeiten wurden mit sterilen Medien, Puffern und Zellkulturgefäßen unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Kulturmedien, fötales Kälberserum (FCS) und Trypsin/EDTA-Lösungen wurden jeweils vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

### 2.3.2.1 Kryokonservierung und Auftauen

Um eukaryontische Zelllinien über einen langen Zeitraum aufbewahren zu können, wurden von frühen Zellpassagen mehrere Aliquots nach deren Empfang bzw. nach deren Herstellung in flüssigem Stickstoff gelagert. Diese Art der Konservierung gewährleistet, dass die Vitalität der Zellen weitestgehend beibehalten wird. Hierzu wurden die Zellen nach Trypsinierung und Pelletierung (s. Abschnitt 2.3.2.2) entweder in 10 ml des jeweiligen Komplettmediums oder in FCS resuspendiert. Je 2 ml dieser Zellsuspensionen wurden mit 5 bis 10 % DMSO versetzt und in spezielle Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst schnell in Eis abgekühlt. Bevor die Zellen letztendlich in flüssigen Stickstoff überführt wurden, erfolgte die weitere Abkühlung stufenweise über eine 2-stündige Lagerung bei -20°C und eine anschließende Lagerung bei -80°C über Nacht.

Um die Zellvitalität der eingefrorenen Zellen während des Auftauvorgangs zu erhalten, wurden sie sehr schnell im 37°C-warmen Wasserbad aufgetaut und dann langsam zu frischem Medium in einem Zellkulturröhrchen pipettiert. Nach Zentrifugation bei 1.200 x g für 3 min erfolgte erneut die Resuspension der Zellen in entsprechendem Medium und deren Transfer in 10 cm-Zellkulturplatten. Dort wurden die Zellen unter regelmäßigem Mediumwechsel bis zum Erreichen einer hohen Konfluenz inkubiert.

55

#### 2.3.2.2 Kultivierung und Passagierung

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien erfolgte mit einem bestimmten Medium (s. Tab. 2.5) im Zellkulturinkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und wassergesättigter Atmosphäre. Dem Medium stabiler Ins-1E-Zelllinien wurde zur Selektion zusätzlich das Antibiotikum G418 (50 µg/ml) beigefügt, sofern die Zellen bis zur nächsten Passagierung ausschließlich der Weiterkultivierung dienten. Während die Zellen für eine weitere Erhaltung der Zelllinie in 10 cm-Kulturschalen ausgesät wurden, erfolgte die Kultivierung der für die jeweiligen Experimente benötigten Zellen in 6-, 12- oder 24-Well-Kulturplatten. Das Medium der Zellen wurde je nach Anzahl der passagierten Zellen grundsätzlich im Abstand von 48 bis 72 h erneuert.

Die Passagierung der Zellen erfolgte ein- bis zweimal wöchentlich, wenn die Zellen eine ausreichende Konfluenz erreicht hatten. AAV293-, BON1-, HeLa-, HepG2-, LNCaP- und MCF-7-Zellen wurden jeweils im Verhältnis 1:10 gesplittet, Ins-1E- und MIN6-Zellen im Verhältnis 1:4. Für die Passagierung der Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal vorsichtig mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,025% Trypsin/0,1 % EDTA) versetzt. Nach einer ca. 3-minütigen Inkubation im Brutschrank wurde das Ablösen der Zellen unter einem Mikroskop (Stereomikroskop BO61; Olympus) beobachtet und gegebenenfalls um wenige Minuten verlängert. Nach vollständiger Abkugelung der Zellen vom Plattenboden wurde das Trypsin durch die Zugabe von 7 ml FCS-haltigem Medium inaktiviert und die Zellsuspension in ein 15 ml-Falcontube überführt. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation für 3 min bei 1200 x g pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml Medium gründlich resuspendiert. Sollten die Zellen für bestimmte Experimente ausgesät werden, so musste nun die Anzahl der Zellen ermittelt werden (s. Abschnitt 2.3.2.3).

#### 2.3.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Um Vergleiche verschiedener Versuchsansätze gewährleisten zu können, mussten die Zellen zunächst gezählt und anschließend jeweils gleiche Zellzahlen in die benötigte Anzahl von Wells ausgesät werden. Dafür wurden die Zellen nach Trypsinierung und Pelletierung (s. Abschnitt 2.3.2.2) in einer geeigneten Menge
(meist 10 ml) Medium resuspendiert und mit Trypanblau angefärbt. 100 µl der Zellsuspension wurden dafür mit 800 µl PBS und 100 µl Trypanblaulösung (0,9 % in NaCl) gemischt und in einer Neubauerzählkammer unter dem Durchlichtmikroskop gezählt. Tote Zellen erschienen blau gefärbt und gingen nicht mit in die Zählung ein. Nach Zählung der lebenden Zellen in den vier großen Eckquadraten der Zählkammer wurde daraus die Anzahl der vorhandenen Zellen wie folgt berechnet:

Anzahl der Zellen x Verdünnungsfaktor / Anzahl der Quadrate = Zellzahl x 10<sup>4</sup> / ml

Die Anzahl der benötigten Zellen variierte je nach verwendeter Zelllinie, der Art des Experiments und der Wellgröße der jeweils gewählten Zellkulturplatten.

## 2.3.3 Transfektionen eukaryontischer Zellen

#### 2.3.3.1 Transiente und stabile Plasmidtransfektion

Die transiente Transfektion der verschiedenen Zelllinien mit Plasmiden erfolgte unter Anwendung des kationischen, liposomalen Transfektionsreagenzes "Roti<sup>®</sup>Fect Plus" der Firma Roth. In Vorversuchen wurden zunächst unter transienter Transfektion des konstitutiv GFP-exprimierenden Plasmids pEGFP-N1 und dessen täglicher Expressionskontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop die besten Transfektionsbedingungen in Anlehnung der Herstellerangaben etabliert. Darauf basierend wurden zu transfizierende Zellen in 24-Multiwell-Platten mit jeweils 500 µl serumhaltigem Medium ausgesät. Die benötigten Zellzahlen unterschieden sich in Abhängigkeit der Zelllinie und sind in Tabelle 2.7 zusammengefasst.

<u>Tab. 2.7.</u> :	Übersicht	der Zellzahle	en verschiedene	r Zelllinien,	die vor	einer	transienten	Trans-
fektion mi	it Überexpre	essionsplasn	niden in 24-Multiv	well-Platten	ausgesä	it wurc	len.	

Name der Zelllinie	Ausgesäte Zellanzahl in 24-Multiwell-Platten		
AAV293	1,0 x 10 <sup>5</sup> Zellen pro Well		
BON1	4,0 x 10 <sup>4</sup> Zellen pro Well		
HeLa	4,0 x 10 <sup>4</sup> Zellen pro Well		
HepG2	1,0 x 10 <sup>5</sup> Zellen pro Well		
Ins-1E	1,5 x 10 <sup>5</sup> Zellen pro Well		

LNCaP	1,0 x 10 <sup>5</sup> Zellen pro Well
MCF-7	7,5 x 10 <sup>4</sup> Zellen pro Well
MIN6	2,0 x 10 <sup>5</sup> Zellen pro Well

Innerhalb einer Stunde nach Aussäen der Zellen erfolgte bereits die Plasmidtransfektion, für diese die Stocklösungen von Plasmid-Midi-DNA und Transfektionsreagenz RT besitzen sollten. Pro Ansatz wurden schließlich 2  $\mu$ g Plasmid-DNA und 6  $\mu$ l "Roti<sup>®</sup>Fect Plus" separat in jeweils 30  $\mu$ l des zelllinienspezifischen Mediums (ohne jeglichen Zusatz) in ein geeignetes Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Vermischung der Lösungen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden beide Ansätze zusammengefügt, zur Komplexbildung zwischen Nukleinsäure und Liposom für 20 min bei RT inkubiert und vorsichtig zu den ausgesäten Zellen pipettiert. Am nächsten Tag erfolgte generell ein Mediumwechsel aller transfizierten Zellen. Je nach Versuchsaufbau wurden die transfizierten Zellen für unterschiedlich lange Zeiten inkubiert und entsprechend weiterbehandelt. Für die Transfektion größerer Mengen Ins-1E-Zellen wurden 3,0 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Well einer 6-Multiwell-Platte ausgesät und die benötigten Ansätze in jeweils 100  $\mu$ I RPMI1640 angesetzt.

Zur Herstellung stabiler Zelllinien wurden Ins-1E-Zellen entsprechend der transienten Transfektionsmethode mit dem gewünschten Überexpressionsvektor in 6-Well-Platten transfiziert. Um die Integration des Vektors ins Genom der Zellen zu erleichtern, wurde dieser vorher durch enzymatischen Verdau innerhalb einer später nicht benötigten DNA-Region mit einem geeigneten "single-cutter" (z.B. Nrul) linearisiert. Die eingesetzte Transfektionsmenge des Vektors betrug außerdem 8 µg pro Ansatz. Dessen Verhältnis zum Transfektionsreagenz von 1:3 wurde jedoch beibehalten. Nach 24 h Inkubation wurde das Medium mit der in Vorversuchen austitrierten Menge von 50 µg/ml des Antibiotikums G418 versehen, welches sich aufgrund der Neomycinkassette der stabil zu transfizierenden Plasmide zur Selektion aller stabilen Zellklone eignete und ab diesem Zeitpunkt immer im Medium beinhaltet war. Nach Erreichen einer geeigneten Konfluenz folgte die Splittung der Zellen vom Well der 6-Well-Platte auf eine 15 cm-Platte, auf der die Zellen bis zur deutlichen Erkennung einzelner Kolonien inkubiert wurden. Dann folgte die Separation einzelner Kolonien mit Hilfe spezieller Stanzzylinder. Dafür wurde eine 1-%-ige "Low Melt Agarose"-Lösung hergestellt (Mikrowelle), im Wasserbad auf 37°C abgekühlt und im Verhältnis 1:1 mit RPMI1640-Medium (mit jeweils doppelter Konzentration aller Zusatzkomponenten) vermischt. Nach Entfernung des alten Mediums wurden davon je 20 ml auf jede 15 cm-Platte gegossen und die Zellen bis zur vollständigen Polymerisierung des Mediums bei RT bzw. bei längeren Polymerisationszeiten (> 30 min) im Brutschrank inkubiert. Zufällig ausgewählte Kolonien wurden anschließend mit Hilfe der Zylinder vom übrigen Medium abgegrenzt, durch kurzfristige Inkubation mit 100 µl Trypsin-EDTA-Lösung von der Platte gelöst und in Wells einer 24-Well-Platte transferiert. In diesen Wells, welche jeweils 1 ml Medium beinhalteten, erfolgte die weitere Inkubation der Zellkolonien bis zu einer Konfluenz von 70 bis 80 %. Diese Zellen wurden schließlich nach Trypsinierung in jeweils zwei Wells einer 24-Well-Platte ausgesät und bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70 bis 80 % inkubiert. Einer der beiden Ansätze diente jeweils der Weiterkultivierung des potentiell stabilen Zellklons, der andere zur Analyse der gewünschten Genintegration im Genom bzw. zum Nachweis dessen Expressionsstärke. Dafür wurde zunächst die gesamte RNA isoliert, mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und für eine semi-quantitative RT-PCR verwendet. Die jeweiligen Primerpaare wurden dabei so gewählt, dass der "forward primer" innerhalb der kodierenden Region des Zielgens hybridisierte, der "reverse primer" auf dem Vektor in unmittelbarer Nähe des Stopcodons. Für die spätere Verwendung stabil transfizierter Zellklone wurden Zellen des jeweils identischen Ansatzes zunächst in 6-Well-Platten, anschließend zur üblichen Erhaltung in 10 cm-Platten unter G418-Selektionsdruck weiterkultiviert.

#### 2.3.3.2 siRNA-Transfektion

Zur Suppression bestimmter Gene wurden Ins-1E-Zellen unter Verwendung des Transfektionsreagenzes "Lipofectamin RNAi MAX" (Invitrogen) revers mit bestimmten siRNA-Nukleotiden transfiziert. Dafür wurden je Well einer 24-Well-Platte 1,5  $\mu$ l "Lipofectamin RNAi MAX" und 50 bis 100 nM siRNA in insgesamt 100  $\mu$ l RPMI1640-Medium (ohne Zusätze) vorgelegt. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT erfolgte pro Well die Zugabe von 1,5 x 10<sup>5</sup>-Zellen in 500  $\mu$ l antibiotikafreiem RPMI1640-Medium. Der erste Mediumwechsel wurde grundsätzlich am nächsten Tag durchgeführt, die komplette Inkubationszeit betrug meist 72 bzw. 96 h. Für die Optimierung der siRNA-Oligonukleotide wurden die Zellen in unterschiedlichen Zellzahlen (1,5 x 10<sup>5</sup> bis 3,0 x 10<sup>5</sup>) ausgesät, verschiedene siRNA-Konzentrationen (1 nM, 10 nM, 50 nM, 80 nM,

100 nM) verwendet und unterschiedlich lange Inkubationszeiten (24 h, 48 h, 72 h, 96 h) gewählt. Nachdem dennoch keine effektive Suppression von OPG auf translationaler Ebene erzielt werden konnte, fand 48 h nach erfolgter Transfektion eine zusätzliche zweite Transfektion der Zellen für weitere 24 bzw. 48 h statt. Die Suppression der Zielgene wurde zunächst auf translationaler Ebene unter Anwendung einer Western-Blot-Analyse untersucht, teilweise zusätzlich auch mit Hilfe einer semi-quantitativen RT-PCR auf transkriptioneller Ebene.

#### 2.3.4 Isolation und Kultivierung muriner Langerhans ´scher Inseln

Für die Isolation Langerhans scher Inseln des Pankreas wurden die Mäuse zunächst unter Anwendung des Inhalationsanästhetikums Isofluran betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Unmittelbar im Anschluss erfolgte mit Hilfe einer Schere an der ventralen Seite die Ablösung des Fells vom Abdomen, dessen Desinfizierung mit Hilfe eines in 70 %-Ethanol getränkten Tupfers und die Öffnung der Bauchdecke durch einen medianen Längsschnitt. Die weiteren Schritte bis zur "Aufspritzung" des Pankreas wurden unter dem Stereoskop SMZ-140 (Motic) durchgeführt. Dafür wurde zunächst der Ductus pancreaticus an seiner Mündungsstelle ins Duodenum mit Hilfe einer Arterienklemme abgeklemmt und die Leberlappen nach cranial mit einem Tupfer fixiert. Dann erfolgte mit einer Injektionskanüle (30G x <sup>1</sup>/<sub>2</sub>) an der Verzweigung von Ductus choledochus und Ductus cysticus die Injektion von 3 ml einer kalten Collagenaselösung (1 mg/ml), so dass das Pankreas langsam über den Ductus pancreaticus "aufgeblasen" wurde. Es folgte nun die vorsichtige Entnahme des Pankreas und dessen Transfer in ein eisgekühltes Falconröhrchen, welches die restliche Collagenaselösung beinhaltete. Nach einer anschließenden, etwa 5-minütigen Inkubation des Pankreas im 37°C-warmen Wasserbad, wurde dessen Zerkleinerung durch gelegentliches, kräftiges Schütteln unterstützt und der enzymatische Verdau stichprobenartig unter dem Stereoskop kontrolliert. Sobald die Inseln einzeln vorlagen, wurde die Collagenaseaktivität durch Zugabe von 45 ml eiskaltem Medium B abgestoppt und das lysierte Pankreasgewebe für 1 min bei 800 x g und 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das verdaute Pankreasgewebe zweimal mit jeweils 25 ml kaltem Medium B (1 min, 800 x g, 4°C) gewaschen, schließlich in 15 ml kaltem Medium B resuspendiert und in eine Petrischale überführt. Die einzelnen Inseln wurden nun unter dem Stereoskop möglichst

60

zügig mit Hilfe einer verlängerten Glaspipette isoliert und entweder sofort für eine RNA-Isolation (s. Abschnitt 2.2.2.1), eine Proteinextraktion (s. Abschnitt 2.4.2.1) bzw. einen Insulinsekretionsassay (s. Abschnitt 2.3.5) verwendet oder zur Regeneration für mindestens einige Stunden kultiviert. Die Kultivierung erfolgte generell im Zellinkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und wassergesättigter Atmosphäre in RPMI1640-Medium mit 10 mM HEPES, 10 % FCS, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Dafür wurden die Inseln mit Hilfe "ausgezogener" Glaspipetten je nach Versuchsaufbau in unbeschichtete 4-Well-Multischalen (Nunc) mit je 700 µl Medium pro Well bzw. in unbehandelte 60 mm-Kulturschalen (Nunc) mit je 4 ml Medium überführt und für maximal eine Woche inkubiert. Bei längeren Inkubationszeiten erfolgte regelmäßig im Abstand von 2 bis 3 Tagen ein Mediumwechsel.

#### 2.3.5 Insulinsekretionsassay

Um die glukoseabhängige Stimulation der Insulinsekretion *in vitro* zu testen, wurde sowohl mit den Insulinomzelllinien Ins-1E und MIN6 als auch mit isolierten Mauspankreasinseln ein sogenannter Insulinsekretionsassay durchgeführt. Alle Inkubationsschritte inklusive der Glukosestimulation fanden dabei im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und wassergesättigter Atmosphäre statt. Die Stimulation erfolgte jeweils mit vier verschiedenen Glukosekonzentrationen im physiologischen Bereich von 2,8 mM bis einschließlich 16,7 mM Glukose und wurde pro Konzentration in einem dreifachen Ansatz durchgeführt.

Für Insulinsekretionsversuche mit Ins-1E-Zellen wurden diese in 24-Multiwell-Platten mit einer Konzentration von 1,5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Well ausgesät, gegebenenfalls transient mit einem entsprechenden Überexpressionsvektor transfiziert und für insgesamt 72 h in komplettem RPMI1640-Medium (s. Abschnitt 2.1.14) inkubiert. Bei einigen Versuchen erfolgte in den letzten 18 h zusätzlich eine Vorinkubation mit rekombinantem Maus-OPG (100 ng/ml). Vor Glukosestimulation wurden die Ins-1E-Zellen einmal mit PBS gewaschen, 2 h in glukosefreiem RPMI1640-Medium inkubiert und zweimal mit glukosefreiem KRBH-Puffer gewaschen. Nach einer weiteren Inkubation für 30 min und einem erneuten Waschschritt mit KRBH-Puffer (ohne Glukose), folgte die 30-minütige Stimulation der Zellen mit 2,8 mM (~ 50 mg/dl), 5,6 mM (~ 100 mg/dl), 11,2 mM (~ 200 mg/dl) bzw. 16,7 mM (~ 300 mg/dl) Glukose in je 1 ml KRBH-Puffer. Die Zellkulturplatte wurde unmittelbar im Anschluss an die

Stimulation auf Eis gestellt, um eine vergleichbare Stimulation der Insulinsekretion aller Ansätze zu gewährleisten. Pro Well wurden 500 µl Überstand in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß pipettiert und für 1 min bei 2.000 rpm und RT zentrifugiert. Der dadurch resultierende Überstand diente zur Bestimmung der sekretierten Insulinmenge mit Hilfe eines geeigneten Insulin-ELISA (s. Abschnitt 2.4.3). Nach Absaugen des restlichen in der Zellkulturplatte befindlichen Mediums wurden die Ins-1E-Zellen in 150 µl Lysepuffer pro Well geschabt, 10 sec bei ca. 20 % Leistung eines Sonifikators (Sonopuls Ultraschall-Homogenisator HD2070; Bandelin) sonifiziert und anschließend zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet.

Insulinsekretionsversuche mit MIN6-Zellen verliefen ähnlich wie die von Ins-1E-Zellen, jedoch mit folgenden Abweichungen: Das Aussäen der MIN6-Zellen erfolgte mit einer Konzentration von 2,0 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Well einer 24-Multiwell-Platte. Für Wasch- und Inkubationsschritte, welche der Glukosestimulation vorangingen, wurde KRBH-Puffer mit 2,8 mM Glukose verwendet. Die Stimulation der MIN6-Zellen erfolgte schließlich mit den Glukosekonzentrationen 2,8 mM, 5,6 mM, 8,4 mM (~ 150 mg/dl) und 11,2 mM für einen Zeitraum von 60 min.

Die glukosestimulierte Insulinsekretion muriner Pankreasinseln fand entweder unmittelbar nach Isolation der Inseln statt oder nach einer Regeneration der Inseln über Nacht in RPMI1640-Medium (s. Abschnitt 2.3.4). Alle Inseln desselben Ansatzes wurden zunächst mit KRBH-Puffer einmal gewaschen und zusammen in 4 ml KRBH-Puffer mit 2,8 mM Glukose in einer 60 mm-Petrischale für 1 h inkubiert. Anschließend erfolgte die einstündige Stimulation der Inseln mit 2,8 mM, 5,6 mM, 11,2 mM bzw. 16,7 mM Glukose. Dafür wurden die Inseln gleichmäßig auf Borosilikatröhrchen verteilt, welche jeweils 500 µl KRBH-Puffer enthielten. Dabei sollte auf eine gleiche Verteilung der Inseln hinsichtlich der Anzahl und Größe der Inseln pro Ansatz geachtet werden. Jedes Röhrchen sollte außerdem mindestens 10 Inseln beinhalten. Der weitere Verlauf des Insulinsekretionsassays von Pankreasinseln verlief entsprechend dem von Ins-1E-Zellen.

## 2.3.6 *In vitro*-Stimulationen von Tumorzellen und Pankreasinseln

Alle Stimulationen *in vitro* fanden in serumfreiem Medium statt. Dabei wurden die rekombinanten Zytokine IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GH, PRL, OPG, RANKL und TRAIL

oder die Fettsäure Palmitat, die Hexose Glukose oder der Proliferationsmarker BrdU entweder einzeln oder in Kombination dem Medium für bestimmte Inkubationszeiten beigefügt. Die Inkubationen mit GH, PRL oder BrdU fanden in serumfreiem Medium mit 0,25 % BSA statt. Da Palmitat in einer BSA-gebundenen Form eingesetzt wurde (Stammlösung: 5 mM Palmitat gebunden an 5 % fettsäurefreiem BSA), erfolgte die dazugehörige Kontrolle in Medium mit der entsprechenden Konzentration von fettsäurefreiem BSA.

Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen zunächst in einer geeigneten Konfluenz in 6-, 12- oder 24-Well-Platten ausgesät, eventuell mit Plasmid-DNA und/oder siRNA transfiziert und für unterschiedlich lange Zeiten in serumhaltigem Medium (s. Tab. 2.5) inkubiert. Dann wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in serumfreiem Medium ohne bzw. mit bestimmten Zusätzen bis zur weiteren Analyse im Brutschrank inkubiert. Für *in vitro*-Stimulationen muriner Pankreasinseln wurden diese nach Isolation für mindestens mehrere Stunden zur Regeneration in serumhaltigem Medium in den Brutschrank gestellt (s. Abschnitt 2.3.4), dann einmal mit serumfreiem Medium gewaschen und anschließend in serumfreiem Medium mit einem oder mehreren Zusätzen für unterschiedlich lange Zeiten inkubiert.

## 2.3.7 Bestimmung der prozentualen Ins-1E-Proliferation

Um den Einfluss von SOCS2 auf die Proliferation von β-Zellen zu bestimmen, wurde sowohl von SOCS2-siRNA-transfizierten Ins-1E-Zellen als auch von stabilen Ins-1E-SOCS2-Klonen die prozentuale Proliferationsrate mit Hilfe des Proliferationsmarkers BrdU bestimmt.

Sollte der Einfluss einer SOCS2-Suppression untersucht werden, wurden pro verwendeter siRNA (siKontrolle, siSOCS2-4, siSOCS-7) jeweils 5 Wells einer 24-Well-Platte mit je 2,0 x 10<sup>5</sup> Ins-1E-Zellen mit jeweils 50 nM siRNA transfiziert. Nach etwa 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen trypsiniert, gleiche Ansätze vereinigt und jeweils 1,5 x 10<sup>5</sup> siRNA-transfizierte Zellen in Wells einer 6-Well-Platte auf 18 x 18 mm-Deckgläschen ausgesät. Letztere wurden kurz vorher durch eine etwa einminütige Inkubation in einer 0,1 %-igen Gelatinelösung (steril) beschichtet und in den Wells der 6-Well-Platte platziert. Die siRNA-transfizierten Ins-1E-Zellen wurden bis zum Abend des nächsten Tages im Brutschrank herangezogen, einmal

mit PBS gewaschen und anschließend ÜN in serumfreiem Medium mit 0,25 % BSA inkubiert. Dann erfolgte eine 24-stündige Inkubation mit BrdU (3,33 nM) und ohne bzw. mit rekombinantem GH (50 ng/ml). Nach einer Immunfluoreszenzfärbung der Zellen mit BrdU-Cy3 und DAPI (s. Abschnitt 2.4.5.2) wurden pro Ansatz mindestens 200 Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und der prozentuale Anteil BrdU-positiver Zellen ermittelt.

Zur Bestimmung der prozentualen Proliferation von Ins-1E- und Ins-1E-SOCS2-Zellen diente dasselbe Protokoll. Die Zellen wurden dafür bereits zu Beginn des Versuches in einer Konzentration von 1,5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro 6-Well auf beschichtete Deckgläschen ausgesät und nach Erreichen einer geeigneten Konfluenz mit BrdU und GH inkubiert. Dabei musste darauf geachtet werden, dass einerseits eine ausreichende Menge an Zellen gewachsen ist, andererseits jedoch die Zellen möglichst einzeln vorlagen, um später eine korrekte Auszählung BrdU-positiver Zellen zu ermöglichen.

## 2.3.8 MTT-Test

Der 1983 von Mosmann beschriebene MTT-Proliferations- und Zytotoxizitätsassay ist ein kolorimetrischer Test, welcher auf der Reduktion des Tetrazoliumsalzes MTT zu Formazankristallen basiert (Mosmann, 1983). Lebende Zellen nehmen das gelbe MTT auf und setzen es mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen in die blauen Formazankristalle um. Aufgrund der Korrelation zwischen Intensität der Blaufärbung und metabolischer Aktivität der Zellen können durch photometrische Messung des Farbumschlages Rückschlüsse auf die Vitalität der Zellen geschlossen werden.

MTT-Tests wurden ausschließlich an adhärenten Tumorzellen angewandt, welche jeweils für eine dreifache Bestimmung in 24-Well-Platten ausgesät und je nach Versuchsaufbau behandelt wurden. Im letzten Versuchsabschnitt erfolgte die Inkubation der Zellen in jeweils 500 µl Medium pro Well. Nach Zugabe von 50 µl einer MTT-Stammlösung (5 mg MTT pro ml RPMI1640-Medium ohne Phenolrot, sterilfiltriert) wurden die Zellen für 90 min im Brutschrank (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Der Überstand wurde im Anschluss verworfen und die wasserunlöslichen Formazankristalle durch eine ca. 5-minütige Inkubation (37°C) mit 550 µl einer Isopropanol/ 10 %-DMSO-Lösung aus den Zellen gelöst. Nach

Pipettieren von je 130 µl Suspension pro 24-Well in eine 96-Well-Platte, wurde die Absorption bei 620 nm (Referenz 0) im Microplate Reader (Tecan) gemessen. Die Vitalitätswerte der Zellen wurden jeweils prozentual als Mittelwerte der Dreifachbestimmungen ermittelt und mit den dazugehörigen Standardabweichungen angegeben.

## 2.3.9 Milzzelldifferenzierungsassay und TRAP-Färbung

Um die Funktionsfähigkeit der rekombinanten Zytokine RANKL und OPG sowie des eigens klonierten OPG-Proteins nachzuweisen, wurde ein Milzzelldifferenzierungsassay mit einer anschließenden TRAP-Färbung angewandt.

Dafür wurde zunächst aus einer 6 Wochen alten C57BL/6-Maus (Männchen oder Weibchen) die Milz entnommen und vollständig von daran haftenden Geweben befreit. Anschließend folgte die Isolation von Leukozyten. Dafür wurde die Milz einmal mit PBS gewaschen und mit Hilfe eines Skalpells und eines Spritzenkolbens in einer 10 cm-Petrischale homogenisiert. Das Homogenisat wurde nun in 3 ml vorgewärmten aMEM-Medium (jeweils auch in den nachfolgenden Schritten mit 10 % FCS, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt) aufgenommen und in eine 15 ml-Falcontube transferiert. Nach 3-minütiger Inkubation bei RT wurde der Überstand in ein neues 15 ml-Falconröhrchen überführt und für 3 min bei 1.200 x g (RT) zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in weiteren 2 ml aMEM-Medium resuspendiert und davon mittels Trypanblaufärbung die Anzahl der isolierten Milzzellen bestimmt (s. Abschnitt 2.3.2.3). Pro Well einer 24-Well-Platte wurden schließlich 2,5 Mio. Zellen in 1 ml aMEM-Medium ausgesät. Zusätzlich wurden verschiedene Zusätze in die jeweiligen Wells pipettiert, um eine Differenzierung der Milzzellen in Osteoklasten zu induzieren.

Für eine Optimierung des Assays wurde in den beiden ersten Versuchsansätzen getestet, welche Konzentration von rekombinantem RANKL bzw. OPG am besten dafür geeignet ist.

#### Versuch 1:

- (1) kein Zusatz bzw. M-CSF (25 ng/ml) als Kontrolle
- (2) M-CSF (25 ng/ml) + RANKL (0,1, 0,3, 1, 3, 10 bzw. 30 ng/ml)
- (3) = (2) + rekombinantes OPG (100 ng/ml)

#### Versuch 2:

- (1) kein Zusatz bzw. M-CSF (25 ng/ml) als Kontrolle
- (2) M-CSF (25 ng/ml) + RANKL (3 ng/ml)
- (3) = (2) + rekombinantes OPG (1, 3, 10, 30, 100 bzw. 300 ng/ml)

In den darauf folgenden Assays diente die optimale RANKL-bzw. OPG-Konzentration als Positiv- bzw. Negativkontrolle für eine Differenzierung der Zellen. Um zu testen, ob das eigens klonierte OPG funktionsfähig ist, wurde der konzentrierte Überstand (s. Abschnitt 2.4.4) transient mit dem Vektor pcDNA3 bzw. pcDNA3-OPG transfizierter Ins-1E-Zellen oder Ins-1E- bzw. stabilen Ins1E-OPG-Zellen verwendet:

#### Weitere Versuche:

- (1) kein Zusatz bzw. M-CSF (25 ng/ml) als Kontrolle
- (2) M-CSF (25 ng/ml) + RANKL (3 ng/ml)
- (3) M-CSF (25 ng/ml) + RANKL (3 ng/ml) + rekomb. OPG (10, 30 bzw. 100 ng/ml)
- (4) = (2) + 1/10 Vol. konzentrierter ÜS Ins-1E-pcDNA3 bzw. Ins-1E
- (5) = (2) + 1/10 Vol. konzentrierter ÜS Ins-1E-pcDNA3-OPG bzw. Ins-1E-OPG

Die verschiedenen Ansätze wurden jeweils doppelt bestimmt. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Zusätze in der Reihenfolge M-CSF, OPG bzw. ÜS und RANKL zugegeben wurden, um eine Bindung von RANKL an seinen eigentlichen Rezeptor vor Zugabe von OPG zu vermeiden und somit eine Verfälschung des Assays zu reduzieren. Nach Aussäen der Milzzellen folgte für mindestens eine Woche die Inkubation im Inkubator (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luftfeuchtigkeit). In dieser Zeit wurde das Medium inklusive der Zusätze M-CSF, RANKL, OPG bzw. konzentrierter Zellüberstande jeden dritten Tag gewechselt. Nach 7 bis 10 Tagen Inkubation erfolgte schließlich der Nachweis von Osteoklasten über die Aktivität der "tartrateresistant acid phosphatase" (TRAP), welche als Differenzierungsmarker genutzt wird. Dafür wurden die Zellen einmal vorsichtig in PBS gewaschen und 5 min in PBS/4 %-

Paraformaldehydlösung fixiert. Nach 3 weiteren Waschschritten mit PBS, wurden die Zellen jeweils in 500 µl Na-Acetat/Weinsäure-Puffer für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 25 µl "Naphtol AS-MX Phosphat" (30 mM; Endkonzentration pro Well 1,5 mM) und 12,5 µl "Fast Red Violet LB salt" (20 mM; Endkonzentration pro Well 0,5 mM) sowie eine ein- bis zweistündige Inkubation bei 37°C. Abschließend wurden die Zellen nochmals 3- bis 4-mal mit PBS gewaschen, schließlich in PBS-Puffer belassen und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Osteoklasten erschienen durch die Aktivität der sauren Phosphatase in einer roten Färbung und wurden dann als Osteoklast gewertet, wenn in der Zelle mindestens drei Zellkerne gezählt werden konnten.

## 2.4 Proteinchemische und immunologische Methoden

## 2.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Proteinen wurde unter Verwendung des "Quant-iT<sup>™</sup> Protein Assay Kits" im dazugehörigen Fluorometer nach Angaben des Herstellers Invitrogen bestimmt.

## 2.4.2 Western-Blot

## 2.4.2.1 Herstellung von Proteinlysat

Für eine Extraktion von Proteinen zur Analyse im Western-Blot wurden sowohl Tumorzellen als auch isolierte Mausinseln einmal mit PBS-Puffer gewaschen, anschließend je nach Ausgangsmenge in 50 bis 300 µl Lysepuffer aufgenommen und in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Bei Tumorzellen erfolgte dies aufgrund ihres adhärenten Wachstums mit Hilfe eines Plastikschabers. Nach 30-minütiger Inkubation unter leichtem Schütteln bei 4°C und einer daran anschließenden 20minütigen Zentrifugation bei 10.000 rpm (4°C) wurde der klare Überstand in ein neues Eppendorfgefäß transferiert und die Proteinkonzentration gemessen (s. Abschnitt 2.4.1). Das restliche Lysat wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

#### 2.4.2.2 Elektrophorese in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). In der vorliegenden Arbeit wurde die Elektrophorese in vertikalen Minigelen (8 x 12 cm) im "Mini-Protean 3 Cell System" der Firma Bio-Rad durchgeführt. Dafür wurden diskontinuierliche 12 %-ige SDS-Polyacrylamidgele hergestellt, deren Zusammensetzung in folgender Tabelle 2.8 aufgelistet ist:

Komponenten	Sammelgel (4,5 %)	Trenngel (12 %)	
30 % Acrylamid-Bisacrylamid	830 µl	6 ml	
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	-	3,75 ml	
1 M Tris-HCl, pH 6,8	630 µl	-	
Aqua dest.	3,4 ml	5 ml	
SDS 10 % (w/v)	50 µl	150 µl	
APS 10 % (w/v)	50 µl	75 µl	
TEMED	5 µl	7,5 µl	

Tab. 2.8: Mengenangaben für 3 diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Minigele.

Zunächst wurden die Trenngele im Gelgießstand bis auf ca. 1 cm unter Kammende gegossen und unmittelbar danach mit destilliertem Wasser überschichtet, welches nach einer Polymerisationszeit von ca. 1 h wieder entfernt wurde. Danach erfolgte das Gießen der Sammelgele auf die polymerisierten Trenngele sowie das sofortige Einsetzen der Probenkämme. Nach einer weiteren Stunde Polymerisationszeit folgte die Entnahme der Gele aus dem Gießstand, das Ziehen der Kämme, das Entfernen von Gelresten von den Platten, das Einspannen der Gele in die Elektrophorese-Apparatur sowie das Füllen der inneren und äußeren Pufferkammer mit SDS-PAGE-Puffer. Nach Versetzen der Proteinproben mit einem nicht-reduzierenden bzw. einem reduzierenden Probenpuffer wurden die Proben zur Denaturierung der Proteine für 5 min bei 95°C gekocht, anschließend 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert und zusammen mit 4 µl eines geeigneten Molekulargewichtsstandards (s. Abschnitt 2.1.6) aufgetragen. Nach der etwa zweistündigen elektrophoretischen Auftrennung der

Proteine bei 100 bis 130 V erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Polyvinyldifluorid-(PVDF)-Membran (Abschnitt 2.4.2.3). Nicht sofort benötigte SDS-Polyacrylamidgele wurden mit VE-Wasser angefeuchteten Papiertüchern sowie einer Frischhaltefolie umwickelt und bis zu ihrem Gebrauch bis zu vier Wochen bei 4°C gelagert.

#### 2.4.2.3 Tank-Blot

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurden diese zunächst, wie in Abschnitt 2.4.2.2 beschrieben, elektrophoretisch in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mittels Elektroblotting aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen (Burnette, 1981). Dieser Transfer erfolgte durch ein sogenanntes Nass- oder Tank-Blotverfahren in einer Blottingapparatur der Firma Bio-Rad. Dazu wurde das Gel nach abgeschlossener Elektrophorese von den Glasplatten gelöst und ebenso wie die durch einminütige Inkubation in 100 % Methanol aktivierte PVDF-Membran für ca. 5 min in Blottingpuffer äquilibriert. Auch die Blottingpapiere und Blottingschwämme wurden kurz mit Blottingpuffer angefeuchtet, bevor ein "Sandwich" aus folgenden Schichten aufgebaut wurde:

- Blottingschwamm
- Blottingpapier
- SDS-Polyacrylamidgel
- aktivierte PVDF-Membran
- Blottingpapier
- Blottingschwamm

Nach korrekter Einspannung des Western-Blot-Sandwiches in die Tank-Blot-Apparatur folgte die ca. 1,5 h dauernde Proteinübertragung auf die PVDF-Membran bei einer angelegten Spannung von 105 V, nach deren Beendigung sich der immunologische Nachweis der nun membrangebundenen Proteine anschloss (s. Abschnitt 2.4.2.4).

#### 2.4.2.4 Immunologische Detektion

Nach Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran (s. Abschnitt 2.4.2.3) wurde diese zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen unter leichtem Schütteln 1 h bei RT in Blockingpuffer inkubiert. Dann erfolgte eine ÜN-Inkubation der Membran in dem mit einem primären Antikörper versetzten AK-Inkubationspuffer. Vor und nach anschließender einstündiger Inkubation mit einem entsprechenden sekundären Antikörper wurde die Membran dreimal für 10 min in Waschpuffer gewaschen, um überschüssige sowie unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen. Alle Wasch- und Inkubationsschritte fanden dabei unter ständigem leichtem Schütteln bei RT statt. Die Nachweisreaktion der Proteine durch die Aktivität der Meerrettich-Peroxidase erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des ECL (Enhanced Chemoluminescence)-Detektionssystems der Firma Thermo Scientific und einer Expositionsdauer von bis zu 30 min.

#### 2.4.2.5 Strippen von PVDF-Membranen

Um sowohl primäre als auch sekundäre Antikörper von PVDF-Membranen zu entfernen und somit eine immunologische Detektion membrangebundener Proteine zusätzlich mit anderen Antikörpern zu ermöglichen, konnte ein Stripping der bereits benutzten PVDF-Membran durchgeführt werden. Dazu wurde die Membran nach abgeschlossener Detektion für mindestens 10 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend für 25 min in 100 % Methanol inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Membran für jeweils 1 min in destilliertem Wasser erfolgten unter leichtem Schütteln eine einmütige Inkubation in 30 ml Strippingpuffer und eine weitere Minute Waschen in destilliertem Wasser. Anschließend wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h ebenfalls unter leichtem Schütteln in Blockingpuffer inkubiert. Nun folgten erneut die bereits im Abschnitt 2.4.2.4 erläuterten Schritte zur immunologischen Detektion mit anderen Antikörpern. Zur Detektion eines bestimmten Proteins sowohl in der phosphorylierten als auch in der nichtphosphorylierten Form wurden die primären Antikörper so gewählt, dass zuerst die phosphorylierte Form des Proteins sichtbar gemacht wurde.

#### 2.4.3 ELISA

Für die Quantifizierung des Insulingehalts verschiedener Proben wurden Insulin-ELISA-Kits nach Angaben der Hersteller verwendet. Die Bestimmung der Insulinkonzentration von Ins-1E-, MIN6- und Mausinselproben, welche im Rahmen eines Insulinsekretionstests gewonnen wurden, erfolgte mit einem Insulin-ELISA-Kit (EZRMI-13K) der Firma Millipore. Für die Konzentrationsbestimmung von Insulin in Blutplasmaproben von Mäusen wurde aufgrund der geringen Konzentrationen und Mengen das "Ultra sensitive mouse Insulin ELISA (90080) Kit" von Crystal Chem. Inc. verwendet.

#### 2.4.4 Konzentrierung von OPG in Zellkulturüberständen

Das Sekretionsprotein OPG wird zunächst intrazellulär als Monomer von ca. 50 bis 55 kDa synthetisiert und bildet dort Homodimere (100 bis 110 kDa), in deren Form hauptsächlich seine Sekretion stattfindet (Simonet et al. 1997). Da OPG jedoch in relativ geringen Mengen synthetisiert und sekretiert wird, musste OPG für einen Nachweis auf translationaler Ebene sowie zum Nachweis seiner Funktionalität im Milzzelldifferenzierungsassay konzentriert werden. Dafür wurden je 2,5 x 10<sup>5</sup> Ins-1E-Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät und transient mit pcDNA3 bzw. pcDNA3-OPG transfiziert (s. Abschnitt 2.3.3.1). Untransfizierte Ins-1E- und stabile Ins-1E-OPG-Zellen wurden ebenso in 6-Well-Platten mit einer ähnlichen Zellzahl ausgesät. Anschließend folgte eine Inkubation für 2 Tage mit dem entsprechenden Komplettmedium (s. Tabelle 2.5), ein Waschen der Zellen mit PBS und eine weitere Inkubation ohne Serum für 24 h. Die Überstände/Medien wurden schließlich mit einer Pipette abgenommen, gleiche Ansätze vereinigt und je nach erhaltenem Volumen (max. 4 ml bzw. 15 ml) in speziellen Filterröhrchen der Firma Amicon (Amicon Ultra-4 bzw. -15 centrifugal filter unit with ultracel-30-membrane) pipettiert. Nach Zentrifugation der Röhrchen in einem schwingenden Rotor bei 4.000 x g für 15 min (RT) wurden die konzentrierten Überstande, in welchen sich ausschließlich Proteine wie OPG mit einem Molekulargewicht von mindestens 30 kDa befanden, in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

## 2.4.5 Immunfluoreszenz/Immunhistochemie

## 2.4.5.1 Hoechst/Propidiumiodidfärbung

Zur visuellen Abschätzung der Vitalitäts- bzw. Apoptoserate isolierter Pankreasinseln wurde eine Doppelfärbung mit Hoechst33342 und Propidiumiodid durchgeführt. Während der Farbstoff Propidiumiodid nur über zerstörte Membranen toter Zellen in den Nukleus eindringen kann, ist der Farbstoff Hoechst33342 aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften auch in der Lage intakte Zellmembranen lebender oder früh apoptotischer Zellen zu passieren. Je nach Art des in die DNA interkalierten Farbstoffes fluoreszieren die Zellen blau (Hoechst33342) oder rot (Propidiumiodid).

Für die Hoechst/Propidiumiodidfärbung wurden die isolierten Mauspankreasinseln nach beendeter Inkubation/Stimulation zunächst einmal gewaschen. Zu diesem Zweck wurden die Inseln mit einer "ausgezogenen" Glaspipette in ein 15 ml-Falconröhrchen pipettiert, mit 1 ml Hanks`BSS versetzt und für 1 min bei 800 x g (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde nun verworfen und jeder Ansatz mit jeweils 989 µl Hanks`BSS, 10 µl Propidiumiodid (Stammlösung: 1 mg/ml) und 1 µl Hoechst33342 (Stammlösung: 20 mg/ml) versetzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT (abgedunkelt) wurden die Inseln erneut zentrifugiert (1 min, 800 x g, RT) und in 1 ml Hanks`BSS vorsichtig resuspendiert. Die nun mit einer Glaspipette in Wells einer 12-Well-Platte transferierten Pankreasinseln konnten nun unter dem Fluoreszenzmikroskop unter Benutzung geeigneter Filter auf ihre Vitalität überprüft werden.

## 2.4.5.2 BrdU/DAPI-Immunfluoreszenzfärbung adhärenter Zellen

Auf gelatinebeschichteten Deckgläschen in einer 6-Well-Platte ausgesäte Zellen wurden nach Beendigung der benötigten Inkubations- bzw. Stimulationszeit einmal für 5 min in PBS gewaschen (s. Abschnitt 2.3.7). Dieser Schritt fand ebenso wie die folgenden Schritte bei RT statt. Nach 10-minütiger Fixierung der Zellen in je 2 ml einer 4 %-igen Paraformaldehydlösung (in PBS) wurden die Zellen für 10 min in PBS-Puffer gewaschen. Dieser war in allen folgenden Wasch- und Antikörper-inkubationsschritten mit 0,1 % Triton X-100 versetzt. Nun folgten jeweils bei 37°C eine 15-minütige Inkubation in HCI (2 N) und eine daran anschließende 10-minütige Inkubation in HCI (0,1 N) mit Pepsin (0,025 mg/ml). Nach zwei erneuten Waschschritten in PBS für 5 min wurden die Zellen für 1 h mit 5 % Normalserum ("normal

72

donkey serum", NDS) geblockt, für eine weitere Stunde mit dem primären Antikörper anti-mouse-BrdU (Verdünnung: 1:1000) inkubiert und 3-mal für 5 min mit PBS gewaschen. Dann erfolgte eine einstündige Inkubation mit einem geeigneten sekundären, fluorochromkonjugierten Antikörper (anti-mouse-Cy3; Verdünnung: 1:750) und drei 5-minütige Waschschritte in PBS. Die Zellen auf den Deckgläschen wurden schließlich für 5 min mit dem selektiv DNA-bindenden Farbstoff DAPI (Verdünnung: 1:10.000) inkubiert, einmal mit PBS und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen, bevor sie mit "mounting medium" eingedeckt auf den Objektträger transferiert wurden.

#### 2.4.5.3 Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten

Für die Immunfluoreszenzfärbung von Pankreasgeweben wurden Paraffinschnitte mit einer Scheibendicke von etwa 4 µm verwendet. Nach Deparaffinierung der Pankreasschnitte durch zwei 10-minütige Inkubationen in 100 % Xylol folgte ebenfalls bei RT die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe. Dafür standen die bestückten Objekträgerschlitten nacheinander für jeweils drei Minuten in 100 %, 95 %, 80 % und 70 % Ethanol. Nach dem letzten Schritt folgten zwei Spülungen für fünf Minuten mit destilliertem Wasser und eine 10-minütige Fixierung der Schnitte in 4 % Paraformaldehyd (in PBS). Alle Wasch- und Antikörperinkubationsschritte fanden, falls nicht anders angegeben, in PBS-Puffer mit 0,1 % Triton X-100 statt. Die Schnitte wurden dann 3-mal für 5 min bei RT gewaschen und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei RT mit 5 % eines geeigneten Normalserums inkubiert. Ähnlich wie bei Inkubationen mit Antikörpern wurde dabei darauf geachtet, dass jeder Schnitt von mindestens 150 µl der jeweiligen Lösung bedeckt war und nicht austrocknen konnte.

Erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung gleichzeitig mit OPG- und Insulin- bzw. Glukagon-Antikörpern, so wurden die Schnitte nun ÜN bei 4°C mit einer Mischung aus beiden Primärantikörpern inkubiert (Verdünnungen: anti-rat-OPG = 1:250; antiguinea pig-Insulin = 1:1000; anti-guinea pig-Glukagon 1:1000). Am nächsten Tag wurden die jeweiligen Objektträger 3-mal für 5 min bei RT gewaschen, 1 h mit einer Kombination aus geeigneten, fluorochromkonjugierten Sekundärantikörpern (anti-rat-Cy3 und anti-guinea pig-Cy2; Verdünnung je 1:800) bei RT inkubiert und weitere 3mal für 5 min gewaschen. Anschließend wurden die Gewebeschnitte einmal mit destilliertem Wasser gespült, mit "mounting medium" eingedeckt, mit Deckgläschen versehen und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

Sollte Insulin und BrdU auf den Pankreasschnitten gefärbt werden, so wurden die jeweiligen Objektträger nach durchgeführter Entparaffinierung, Rehydrierung, Fixierung und Blockierung ÜN bei 4°C mit dem ersten Primärantikörper (anti-guinea pig-Insulin; Verdünnung 1:1000) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3mal für 5 min mit PBS/Triton X-100 gewaschen und für 1 h mit dem ersten Sekundärantikörper anti-guinea pig-Cy2 (Verdünnung: 1:750) bei RT inkubiert. Nach einem Waschen der Schnitte (3 x 5 min) folgte eine erneute Fixierung für 30 min (RT) in einer 4 % Paraformaldehyd/PBS-Lösung und drei weitere Waschschritte für 5 min. Die Objektträger wurden nun bei 37°C zunächst für 15 min in HCI (2 N), dann 1 min in HCI (0,1 N) mit Pepsin (0,025 mg/ml) inkubiert und wieder gewaschen (3 x 5 min). Nun folgte eine erneute Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation bei RT mit 5 % Normalserum (NDS). Dieses stammte wie üblich aus der Tierspezies, in welcher der sekundäre Antikörper generiert wurde. Der zweite Primärantikörper (anti-mouse-BrdU; Verdünnung 1:500) wurde anschließend ÜN bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte schließlich die einstündige Inkubation mit dem zweiten Sekundärantikörper (anti-mouse-Cy3; Verdünnung 1:750) bei RT. Vor und nach dieser Inkubation wurden die Pankreasschnitte wie üblich 3-mal für 5 min gewaschen. Zuletzt folgte eine kurzes Spülen der Schnitte mit destilliertem Wasser, das Eindecken mit "mounting medium" und das Auflegen passender Deckgläschen. Die Lagerung der Objektträger bis zum Gebrauch fand bei 4°C statt.

#### 2.4.5.4 Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten

Für die immunhistochemische Färbung von Pankreasgeweben wurden die Schnitte zunächst, wie in Abschnitt 2.4.5.3 beschrieben, deparaffiniert und rehydriert. Dann erfolgte eine Vorbehandlung der Schnitte zur Demaskierung der antigenen Determinanten. Dafür wurden die jeweiligen Objektträger mit 10 mM Natriumcitrat überschichtet und für 30 min in einem Dampfdruckgerät inkubiert. Die anschließende immunhistochemische Färbung fand unter Anwendung des "Vectastain<sup>®</sup>ABC-AP Kits" und des "Vector<sup>®</sup>NovaRED<sup>™</sup> Substrate Kits" nach Angaben des Herstellers Vector Laboratories statt. Dafür wurden als Primärantikörper anti-guinea pig-Insulin

bzw. anti-guinea pig-Glukagon in einer Verdünnung von 1:500 bzw. 1:1000 verwendet und biotinyliertes anti-guinea pig-IgG (1:500) als sekundärer Antikörper. Die vor Färbung notwendige Blockierung unspezifischer Bindungsstellen fand dementsprechend mit "normal goat serum" statt.

#### 2.4.5.5 TUNEL-Färbung

Um die Anzahl apoptotischer Zellen zu bestimmen, erfolgte eine Markierung fragmentierter DNA-Bruchstücke mit Hilfe einer TUNEL-("terminale deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling")-Färbung unter Anwendung des "QIA33 FragEL™ DNA Fragmentation Detection – Colorimetric-TdT Enzyme-Kits". Mit Ausnahme der von 20 min auf 40 min verlängerten Proteinase K-Inkubations-dauer, erfolgte die Durchführung nach Angaben des Herstellers Calbiochem. Unter dem Lichtmikroskop wurde anschließend pro Versuchstier die Gesamtzahl TUNEL-positiver Inselzellen eines repräsentativen Pankreasschnittes ermittelt und in Relation zu 100 der dafür quantifizierten Inselquerschnitte gesetzt.

## 2.5 Tiermodell

## 2.5.1 Gewichtsbestimmung

Die Ermittlung des Körper- und Pankreasgewicht von Mäusen fand mit Hilfe einer Präzisionswaage (Sartorius) bzw. einer Analysenwaage (Sartorius) statt und war zwingend notwendig, wenn eine immunhistologische Bestimmung der  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Zellmasse folgten. Für die Injektion von Glukose, Insulin oder Streptozotocin im Rahmen bestimmter Versuche war vor Testbeginn ebenfalls ein Wiegen der jeweiligen Mäuse zur Errechnung der Menge der zu injizierenden Substanz erforderlich.

## 2.5.2 Blutzuckerbestimmung und Isolation von Blutplasma

Für die Blutzuckerbestimmung und Isolation von Blutplasma wurde immer Blut aus der Schwanzvene der jeweiligen Mäuse entnommen. Dafür wurde der Schwanz zunächst mit 70 %-Ethanol desinfiziert. War pro Tag nur eine einmalige Blutentnahme notwendig, so erfolgte diese aus einer mit dem Skalpell angeritzten Schwanzvene. Aufgrund der im Rahmen von Glukose- und Insulintoleranztests mehrmals innerhalb eines kurzen Zeitraums erforderlichen Blutentnahmen wurden die Schwanzspitzen der Tiere zusätzlich mit einer anästhesierenden Creme (Emla) eingerieben. Nach einer vorgeschriebenen Einwirkzeit von 15 min wurden dann für eine erleichterte Blutabnahme mit Hilfe eines Skalpells 1 bis 2 mm der keine knöchernen Strukturen besitzenden Schwanzspitze abgeschnitten.

Für die Ermittlung der Blutzuckerkonzentration wurden Ascensia CONTOUR<sup>®</sup> Teststreifen von Bayer und das dazugehörige Messgerät Ascensia CONTOUR verwendet. Die Blutabnahme für die Isolation des Plasmas erfolgte mittels einer di-Kalium-EDTA Microvette von Sarstedt. Dafür waren jeweils ca. 20 µl erforderlich, die anschließend für 3 min bei 3.000 rpm zentrifugiert wurden. 5 bis 10 µl des überstehenden Blutplasmas wurden in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß pipettiert und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

#### 2.5.3 Glukosetoleranztests

Zur Bestimmung der Glukosetoleranz der untersuchten Mäuse wurden sowohl intraperitoneale (ip) als auch intravenöse (iv) Glukosetoleranztests (GTT) durchgeführt. Dafür wurden die betroffenen Tiere unmittelbar vor Versuchsbeginn für die Dauer von 6 h gefastet und anschließend gewogen. Nach Messung des Blutzuckerspiegels (t<sub>0</sub>) und Abnahme von ca. 15 bis 20 µl Blut für die spätere Bestimmung der dazugehörigen Plasmainsulinkonzentration (ELISA), wurde den Tieren maximal ein Volumen von 250 µl einer sterilen Glukoselösung injiziert. Es erfolgte dabei entweder eine intraperitoneale Injektion von 2 g Glukose pro kg Körpergewicht (ip-GTT) oder eine intravenöse Injektion von 1 g Glukose pro kg Körpergewicht (iv-GTT). Ab diesem Zeitpunkt wurde den Mäusen nach bestimmten Zeiten (beim ip-GTT: 15 min, 30 min, 60 min, 90 min und 120 min; beim iv-GTT: 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min und 60 min) erneut 15 bis 20 µl Blut zur Bestimmung von Blutzucker- und Plasmainsulinkonzentration aus der Schwanzspitze entnommen. Während der gesamten Versuchsdauer dienten über den Käfigen angebrachte Wärmelampen für eine adäquate Temperatur. Des Weiteren stand den Tieren in dieser Zeit sowie in der vorangehenden Fastenperiode unbegrenzt Trinkwasser zur Verfügung.

## 2.5.4 Insulintoleranztest

Um Aussagen über die Insulinsensitivität der Versuchstiere zu ermöglichen, wurden intraperitoneale Insulintoleranztests durchgeführt. Die Vorgehensweise war dabei bis auf folgende Abweichungen völlig identisch mit den in Abschnitt 2.5.3 beschriebenen ip-GTTs: Den Tieren wurde keine Glukoselösung, sondern 750 IU einer sterilen Insulinlösung pro kg Körpergewicht verabreicht (maximal 250 µl) und das zu den Zeitpunkten 0 min, 15 min, 30 min, 60 min und 90 min aus der Schwanzspitze entnommene Blut lediglich zur Bestimmung der Blutzuckerkonzentration herangezogen.

## 2.5.5 "Multiple-low-dose-Streptozotocin"-Behandlung

Für die Induktion eines Diabetes mellitus wurde in der vorliegenden Arbeit die "Multiple-low-dose-Streptozotocin"-Methode (MLDS) gewählt. Das  $\beta$ -Zelltoxin STZ wurde unmittelbar vor Injektion in 20 mM Citrat-Puffer (pH 4,5) gelöst, sterilfiltriert und den Tieren an 5 aufeinander folgenden Tagen intraperitoneal in einer relativ niedrigen Konzentration von 40 mg pro kg Körpergewicht injiziert. Das Injektionsvolumen betrug maximal 100 µl. Kontrolltiere erhielten jeweils das entsprechende Volumen Citrat-Puffer. Innerhalb der nächsten 2 Wochen wurde von allen Tieren beinahe täglich zur gleichen Tageszeit der Blutzuckerspiegel gemessen. Überschritt ein Wert die Grenze von 250 mg/dl, so erfolgte am nächsten Tag die Blutzuckerbestimmung nach einer Nahrungskarenz von 6 h.

## 2.5.6 Präparation von Pankreasgewebe

Um morphologische/histologische Bestimmungen der Pankreata vornehmen zu können, erfolgte zunächst die Betäubung der Mäuse mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran und deren Tötung durch zervikale Dislokation. Unmittelbar im Anschluss wurde das Fell der Tiere mit Hilfe einer Schere an der ventralen Seite abgelöst, der Bauchraum mit 70 %-Ethanol desinfiziert und die Bauchdecke durch einen medianen Längsschnitt geöffnet. Das Pankreas wurde nun von Fettgewebe und größtenteils von angrenzendem Darm- und Milzgewebe isoliert und zusammen mit einem kleinen Teil von Darm und Milz entnommen. Für entsprechende Versuche schloss sich nun eine zügige Bestimmung des Pankreasgewichtes an, bevor das Gewebe ÜN bei 4°C in PBS-Puffer mit 4% Paraformaldehyd fixiert und anschließend paraffiniert wurde.

## 2.5.7 Bestimmung von $\beta$ - und $\alpha$ -Zellmasse muriner Pankreata

Für die Ermittlung der β-Zellmasse verschiedener Mauspankreata wurden zunächst die Pankreasgewebe immunhistochemisch mit einem Insulinantikörper gefärbt (s. Abschnitt 2.4.5.4) und anschließend im Hellfeld bei einer 400-fachen Vergrößerung im Axioskop 40 (Zeiss) analysiert. Von jeder Maus wurde jeweils ein Objektträger mit Pankreasgewebe ausgewertet. Dies geschah mit Hilfe einer speziellen, im Okular fixierten Vorlage, welche aus insgesamt 121 regelmäßigen, im Quadrat angeordneten Gitterpunkten bestand. Während der systematischen Untersuchung des Pankreasgewebes wurde von jedem der mindestens 150 zufällig ausgewählten Gesichtsfelder die Anzahl der Gitterpunkte gezählt, welche auf Pankreasgewebe ( $P_P$ ), anderes Gewebe (z.B. Fett- oder Milzgewebe;  $P_A$ ) oder auf insulinpositive Pankreaszellen ( $P_β$ ) trafen. Anschließend wurden alle pro Objektträger gezählten Punkte derselben Kategorie addiert und die β-Zellmasse unter Einbeziehung des Pankreasgewichtes folgendermaßen berechnet:

[Summe  $P_{\beta}$  / (Summe  $P_{P}$  + Summe  $P_{A}$  + Summe  $P_{\beta}$ )] x Pankreasgewicht in mg = =  $\beta$ -Zellmasse in mg

Die Bestimmung der pankreatischen  $\alpha$ -Zellmassen verlief analog zu der von  $\beta$ -Zellmassen. Dafür wurden die  $\alpha$ -Zellen der Pankreasgewebe immunhistochemisch mit Glukagonantikörpern gefärbt und anschließend die Gitterpunkte glukagon-positiver  $\alpha$ -Zellen (P $_{\alpha}$ ) gezählt. Die  $\alpha$ -Zellmasse konnte nun wie folgt berechnet werden:

[Summe  $P_{\alpha}$  / (Summe  $P_{P}$  + Summe  $P_{A}$  + Summe  $P_{\alpha}$ )] x Pankreasgewicht in mg = =  $\alpha$ -Zellmasse in mg

Repräsentative Fotografien der immunhistochemischen Färbungen wurden in einer 200-fachen Vergrößerung am Mikroskop BX41 der Firma Olympus mit einer digitalen Farbkamera (Typ XC30; Olympus) aufgenommen.

## 2.5.8 Bestimmung der *in vivo*-Proliferation pankreatischer β-Zellen

Zur Bestimmung der in vivo-Proliferation von β-Zellen im Mausmodell wurde den entsprechenden Versuchstieren für die Dauer von einer Woche der Proliferationsmarker BrdU in einer Konzentration von 100 mg/ml mit dem Trinkwasser zugeführt. Nach anschließender Tötung, Isolation des Pankreas und Präparation geeigneter Paraffinschnitte erfolgte unter Verwendung geeigneter Antikörper eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Insulin-Cy2 und BrdU-Cy3. Insulin wurde dabei im Zytoplasma von β-Zellen sichtbar, BrdU aufgrund seiner als Thymidinanalgon ermöglichten DNA-Inkorporation im Zellkern. Die unter dem Axioskop 40 der Firma Zeiss mit einer Digitalkamera (Modell CFW 1312M, Scion Corporation) fotografierten Pankreasinseln wurden schließlich mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop CS4 ausgewertet. Pro Maus wurde dafür mindestens von 15 Inseln die Gesamtanzahl sowohl der β-Zellen (insulinpositiv) als auch der proliferierenden β-Zellen (insulinund BrdU-positiv) gezählt und aus den jeweiligen Summen der prozentuale Anteil proliferierender β-Zellen errechnet. Als Positivkontrolle für eine auswertbare BrdU-Färbung diente aufgrund seiner hohen Proliferationsrate ein beliebiger Darmabschnitt, welcher zusammen mit dem Pankreas präpariert und gefärbt wurde (Abb. 2.2).



<u>Abb. 2.2</u>: Immunfluoreszenzfärbung mit BrdU-Cy3. Dargestellt ist ein repräsentativer Darmabschnitt einer C57BL/6-Maus, welcher als Positivkontrolle für eine gelungene BrdU-Cy3-Färbung des gesamten Gewebeschnittes diente.

## 2.5.9 Bestimmung des relativen HOMA-IR-Index

Um die Insulinresistenz der verwendeten db/db-Mäuse beurteilen und vergleichen zu können, wurde der sogenannte relative HOMA-IR-("homeostasis model assessment of insulin resistance")-Index berechnet. Dieser Index wurde kürzlich anhand von Glukose-Clamp-Daten auch für Mäuse validiert und stellt ein relativ gutes Maß der systemischen Insulinresistenz dar (Lee *et al.*, 2008). Für die Bestimmung des relativen HOMA-IR wurde pro Tier die nach einer Nahrungskarenz von 6 h gemessene Blutzuckerkonzentration mit der dazugehörigen Plasmainsulinkonzentration multipliziert und anschließend in Relation zu den db/+-Kontrolltieren gesetzt. Letzteren wurde dabei im Alter von 5 Wochen der Wert 1 zugeordnet.

## 2.6 Computeranalyse/Statistik

Für die Berechnung von Summen, Mittelwerten, Standardabweichungen und statistischen Differenzen wurde das Programm Microsoft Excel verwendet. Statistik-Anwendung berechnungen fanden unter des zweiseitigen, ungepaarten Student'schen t-Tests statt. Im Rahmen von in vitro-Assays wurde der t-Test unter der Annahme gleicher Varianzen durchgeführt, für die Wahrscheinlichkeitsberechnung im Tiermodell unter der Annahme verschiedener Varianzen. Die Bestimmung der AUC ("area under the curve")-Werte und deren statistischer Vergleich erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaPlot. Generell wurde ein Unterschied als signifikant definiert, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p einen Wert kleiner als 0,05 ergab. Im Rahmen der Glukose- und Insulintoleranztests wurde ein Ergebnis aufgrund der fünf verwendeten Messpunkte erst mit einem p von kleiner 0,01 als signifikant gewertet. Um die Standardabweichungen von Quotienten (der jeweiligen Mittelwerte aus nüchterner Plasmainsulinmenge und β-Zellmasse) zu ermitteln, wurde ein Onlineprogramm (http://laffers.net/tools/error-propagation-calculator.php) verwendet. Letzteres wurde auch unter Anwendung des propagierten Fehlers für die zugehörige statistische Auswertung herangezogen.

# 3. Ergebnisse

## 3.1 Das db/db-Mausmodell:

# Zelluläre Aspekte der β-Zelldysfunktion in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus

Das 1966 entdeckte Typ-2-Diabetesmodell der db/db-Maus besitzt aufgrund einer autosomal rezessiven Mutation in beiden Allelen des db-Gens einen funktionsunfähigen Leptinrezeptor (Hummel et al., 1966; Lee et al., 1996). Die dadurch hervorgerufene Störung im "Leptinsignaling" führt zur Polyphagie der Tiere, die bereits im Alter von 3 bis 4 Wochen spontan eine Adipositas mit einer damit assoziierten peripheren Insulinresistenz entwickeln. Der sich etwa in 16 % aller Allele unterscheidende genetische Hintergrund der beiden in dieser Arbeit verwendeten db/db-Mausstämme führt dazu, dass Mäuse mit einem C57BL/6J-Hintergrund (db/db B6) den erhöhten Insulinbedarf dauerhaft kompensieren können, während Tiere mit einem C57BLKS/J-Hintergrund (db/db BKS) wegen ihrer fehlenden Anpassungsfähigkeit einen Typ-2-Diabetes mellitus entwickeln (Hummel et al., 1972). Durch einen Vergleich dieser beiden Mauslinien bezüglich verschiedener Parameter sollten in der vorliegenden Arbeit neue Erkenntnisse über die sequenzielle Abfolge der Ereignisse gewonnen werden, welche sich in diesem Tiermodell bei der Entstehung eines Typ-2-Diabetes mellitus abspielen. Auf diese Weise sollten die zellulären Mechanismen geklärt werden, welche die Diabetesentstehung bzw. die Resistenz gegenüber dieser Erkrankung vermitteln. Da aus anderen Studien bereits bekannt war, dass db/db BKS-Mäuse im Alter von etwa 8 Wochen eine Hyperglykämie entwickeln, wurden alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen auf ein Alter von 5 bis einschließlich 12 Wochen limitiert (Lee & Bressler, 1981). Zur Gewinnung physiologischer Vergleichswerte wurden zusätzlich als externe Kontrollen heterozygote Mäuse (db/+) ohne Neigung zur Adipositas und mit einem nahezu normalen Glukosemetabolismus herangezogen.

#### 3.1.1 Adipositasentwicklung bei db/db-Mäusen

Wie aus Abbildung 3.1 ersichtlich, wurde von allen db/db- und db/+-Tieren einmal wöchentlich das Körpergewicht bestimmt (Abb. 3.1).



<u>Abb. 3.1</u>: Körpergewichtskurve der db/db B6-, db/db BKS- und db/+-Mäuse im Alter von 5 bis 12 Wochen. Das Körpergewicht der jeweiligen Mäuse wurde ab einem Alter von 5 Wochen bis zum Tod der Mäuse in einem Alter von maximal 12 Wochen einmal wöchentlich bestimmt. Angegeben sind pro Zeitpunkt die Mittelwerte und dazugehörigen, positiven Standardabweichungen von mindestens 7 db/db B6-Mäusen, mindestens 6 db/db BKS-Mäusen und mindestens 2 heterozygoten (db/+ B6 und db/+ BKS gemischt) Kontrollmäusen. Die unter Anwendung des t-Tests ermittelten statistischen Signifikanzen (p < 0,05) sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet und beziehen sich ausschließlich auf Differenzen zwischen den beiden homozygoten Mausstämmen (db/db B6 und db/db BKS).

Wie erwartet, zeigten beide homozygoten db/db-Mausstämme ab einem Alter von 5 Wochen eine rasche, kontinuierliche Gewichtszunahme bis zu einem Alter von 10 bzw. 11 Wochen (db/db B6 bzw. db/db BKS) und erreichten letztendlich das doppelte Körpergewicht der heterozygoten Kontrollen. Diese hielten über den gesamten Zeitraum ein relativ konstantes Gewicht von ca. 20 g. Im direkten Vergleich der homozygoten Tiere fällt auf, dass die Gruppe der db/db BKS-Mäuse durchschnittlich eine minimal stärkere Adipositas entwickelte als die Gruppe der ebenfalls adipösen db/db B6-Mäuse, welche im Alter von 11 und 12 Wochen durchschnittlich 10,4 % weniger wogen (Abb. 3.1).

# 3.1.2 Vergleich der Nüchternblutzuckerspiegel von db/db-Mäusen mit C57BL/6J- und C57BLKS/J-Hintergrund

Um Aussagen über den Beginn bzw. die Ausprägung eines Diabetes mellitus zu ermöglichen, wurde von allen db/db- und db/+-Mäusen einmal wöchentlich die Blutzuckerkonzentration im nüchternen Zustand ermittelt (Abb. 3.2).



<u>Abb. 3.2</u>: Blutzuckerkurve nüchterner db/db B6-, db/db BKS- und db/+-Mäuse im Alter von 5 bis 12 Wochen. Die Blutzuckerkonzentration der jeweiligen Mäuse wurde ab einem Alter von 5 Wochen bis zum Tod der Mäuse in einem Alter von maximal 12 Wochen einmal wöchentlich bestimmt. Die Bestimmung erfolgte nach einer Nahrungskarenz von 6 h. Angegeben sind pro Zeitpunkt die Mittelwerte und dazugehörigen, positiven Standardabweichungen von jeweils mindestens 5 Tieren der beiden homozygoten db/db-Gruppen und mindestens 2 Tieren der Gruppe heterozygoter (db/+ B6 und db/+ BKS gemischt) Kontrollmäuse. Die unter Anwendung des t-Tests erhaltenen statistischen Signifikanzen (p < 0,05) sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet und beziehen sich ausschließlich auf Differenzen zwischen den beiden homozygoten Mausstämmen (db/db B6 und db/db BKS).

Wie im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe der db/+-Mäuse mit einem relativ konstanten Blutzuckerspiegel bei 90 mg/dl ersichtlich wird, tendierten db/db-Mäuse mit einem C57BL/6J-Hintergund zu leicht höheren, aber nicht signifikant unterschiedlichen Blutzuckerkonzentrationen (105,87 ± 25,99 bis 151,47 ± 59,19 mg/dl). Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass db/db-Mäuse mit C57BLKS/J-Hintergrund ab einem Alter von 9 Wochen einen manifesten Diabetes mellitus mit Nüchternblutzuckerwerten über 200 mg/dl entwickelten. Diese erreichten nach einem kontinuier-

lichen Anstieg mit 11 Wochen ihr Maximum (382,0  $\pm$  38,85 mg/dl) und waren zu diesem Zeitpunkt 3-mal höher als die von db/db B6-Mäusen (Abb. 3.2).

## 3.1.3 Vergleich der basalen Plasmainsulinspiegel von db/db-Mäusen mit C57BL/6J- und C57BLKS/J-Hintergrund

Die Abnahme des Blutplasmas der db/db- und db/+-Mäuse für die Messung der Insulinspiegel erfolgte zum selben Zeitpunkt wie die Bestimmung der Blutzuckerkonzentration, d.h. einmal wöchentlich nach einer Nahrungskarenz von 6 h und in einem Alter von 5 bis einschließlich 12 Wochen (Abb. 3.3).



<u>Abb. 3.3</u>: Plasmainsulinkurve nüchterner db/db B6-, db/db BKS- und db/+-Mäuse im Alter von 5 bis 12 Wochen. Die Plasmainsulinkonzentration der jeweiligen Mäuse wurde ab einem Alter von 5 Wochen bis zum Tod der Mäuse in einem Alter von maximal 12 Wochen einmal wöchentlich bestimmt. Die Bestimmung erfolgte nach einer Nahrungskarenz von 6 h. Angegeben sind pro Zeitpunkt die Mittelwerte und dazugehörigen, positiven Standardabweichungen von jeweils mindestens 5 Tieren der beiden homozygoten db/db-Gruppen und mindestens 2 Tieren der heterozygoten (db/+ B6 und db/+ BKS gemischt) Kontrollmäuse. Die unter Anwendung des t-Tests ermittelten statistischen Signifikanzen (p < 0,05) sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet und beziehen sich ausschließlich auf Differenzen zwischen den beiden homozygoten Mausstämmen (db/db B6 und db/db BKS).

Beide db/db-Mausstämme entwickelten zunächst im Vergleich zu gesunden db/+-Kontrolltieren mit einer durchschnittlichen Plasmainsulinkonzentration von 0,67 ± 0,30 ng/ml eine Hyperinsulinämie. Während db/db-Mäuse mit C57BLKS/J-Hintergrund ihre maximale Insulinsekretionskapazität bereits im Alter von 7 Wochen besaßen (6,72  $\pm$  3,28 ng/ml) und anschließend einen kontinuierlichen Abfall der sekretierten Insulinmengen zeigten, stiegen die der db/db B6-Mäuse ab diesem Zeitpunkt noch weiter an (Abb. 3.3).

#### 3.1.4 Relative Insulinresistenz (HOMA-IR) von db/db-Mäusen

Um Aussagen über die Insulinresistenz der zu vergleichenden db/db-Mausstämme zu ermöglichen, wurde mit Hilfe der jeweils im nüchternen Zustand gemessenen Blutzucker- und Plasmainsulinkonzentrationen (s. Abschnitt 3.1.2 und 3.1.3) der relative "homeostasis model assessment of insulin resistance"-Index (HOMA-IR) ermittelt. Die Berechnung des HOMA-IR erfolgte in Relation zu den db/+-Kontroll-tieren, welchen im Alter von 5 Wochen ein Wert von 1 zugeordnet wurde (Abb. 3.4).



<u>Abb. 3.4</u>: Relativer HOMA-IR von db/db B6-, db/db BKS- und db/+-Mäusen im Alter von 5 bis 12 Wochen. Der relative HOMA-IR wurde aus den Blutzucker- und Plasmainsulinkonzentrationen berechnet, welche jeweils nach einer Nahrungskarenz von 6 h einmal wöchentlich im Alter von 5 bis einschließlich 12 Wochen bestimmt wurden. Der Gruppe der 5 Wochen alten db/+-Tiere wurde dabei ein Wert von 1 zugewiesen. Die angegebenen Mittelwerte und dazugehörigen, positiven Standardabweichungen wurden pro Zeitpunkt von jeweils mindestens 5 Tieren der beiden homozygoten db/db-Gruppen und mindestens 2 Tieren der heterozygoten (db/+ B6 und db/+ BKS gemischt) Vergleichsmäuse errechnet.

Anhand der Darstellung der relativen HOMA-Indizes in Abbildung 3.4 wird ersichtlich, dass beide db/db-Mausstämme im Vergleich zu den gesunden db/+-Kontrolltieren erwartungsgemäß deutlich insulinresistent waren. Tiere mit einem C57BL/6J-Hinter-

grund zeigten dabei eine tendenziell noch stärkere Insulinresistenz als Mäuse mit einem C57BLKS/J-Hintergrund. Der relative HOMA-Index beider homozygoter Gruppen stieg jeweils bis zu einem Alter von 9 Wochen stark an und erreichte in dieser Alterskategorie durchschnittlich 37- bzw. 25-fach höhere Werte (db/db B6 bzw. db/db BKS) als die Gruppe der heterozygoten db/+-Tiere. Letztere waren bereits im Alter von 5 Wochen durchschnittlich um das 8,3-fache insulinsensitiver als leptinrezeptordefekte db/db-Mäuse derselben Altersgruppe (Abb. 3.4). Da zwischen den beiden homozygoten Mausstämmen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in der Insulinresistenz bestanden, konnte eine unterschiedlich ausgeprägte Beeinträchtigung der Insulinsensitivität als Ursache der verschiedenen Phänotypen weitgehend ausgeschlossen werden.

# 3.1.5 Analyse der Inselmorphologie von db/db-Mäusen mit C57BL/6J- und C57BLKS/J-Hintergrund: Bestimmung der βund α-Zellmasse

Neben einer Verbesserung der  $\beta$ -zellulären Insulinsekretionskapazität gehört eine Expansion der  $\beta$ -Zellmasse zu den möglichen Mechanismen, die während der Kompensierung eines erhöhten Insulinbedarfs auftreten (Steil *et al.*, 2001). Vor dem Hintergrund der unterschiedlich starken Hyperinsulinämien beider db/db-Mausstämme war es aus diesem Grund von Interesse aufzuklären, inwiefern die  $\beta$ -Zellmasse in deren unterschiedlicher Anpassungsfähigkeit involviert ist (Abb. 3.3; Abb. 3.4). Es wurde deshalb immunhistochemisch die  $\beta$ -Zellmasse bestimmt. Zusätzlich wurde unter Einbeziehung der Werte aus Abbildung 3.1 bzw. 3.3 deren Verhältnis zu Körpergewicht bzw. zur basalen Insulinsekretionsmenge berechnet (Abb. 3.5).



<u>Abb. 3.5</u>: Altersabhängiger Verlauf der β-Zellmasse (A) und deren Verhältnis zum Körpergewicht (B) bzw. zur Plasmainsulinsekretion im nüchternen Zustand (C) von db/db B6-, db/db BKS- und db/+-Mäusen. Die einzelnen Parameter wurden im Alter von 7, 8, 10 und 12 Wochen bestimmt. Angegeben sind pro Zeitpunkt die Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen

von db/db B6-Mäusen (n  $\ge$  4), db/db BKS-Mäusen (n  $\ge$  3) und heterozygoten (db/+ B6 und db/+ BKS gemischt; n  $\ge$  2) Kontrollmäusen. In (A) sind zusätzlich die jeweiligen linearen Regressionsgeraden (blau) eingezeichnet. In (C) sind die Quotienten der jeweiligen Mittelwerte sowie die mit Hilfe eines Onlineprogramms propagierte positive (B6) bzw. negative (BKS) Standardabweichung angegeben. Die unter Anwendung des t-Tests ermittelten statistischen Signifikanzen (p < 0,05) sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet und beziehen sich ausschließlich auf Differenzen zwischen den beiden homozygoten Mausstämmen (db/db B6 und db/db BKS).

Es konnte nachgewiesen werden, dass 7 Wochen alte db/db-Mäuse unabhängig vom genetischen Hintergrund eine etwa 5,5-fach größere  $\beta$ -Zellmasse besaßen als gesunde db/+-Kontrolltiere, welche über den gesamten Bestimmungszeitraum eine relativ konstante β-Zellmasse aufwiesen (Abb. 3.5A). Ähnliches spiegelte sich auch im Verhältnis der  $\beta$ -Zellmasse zum Körpergewicht wider (Abb. 3.5B). Wie besonders anhand der linearen Regressionsgeraden deutlich ersichtlich, blieb die durchschnittliche β-Zellmasse bei Homozygoten mit C57BLKS/J-Hintergrund zwischen 7 und 12 Wochen relativ konstant, während Homozygote mit C57BL/6J-Hintergrund kontinuierlich eine weitere, altersabhängige Expansion der β-Zellmasse zeigten (Abb. 3.5A; Abb. 3.6). Im direkten Vergleich der  $\beta$ -Zellmassen beider db/db-Mausstämme ergaben sich daraus mit 12 Wochen signifikante Unterschiede (BKS:  $3,12 \pm 1,37$  vs. B6: 8,87 ± 4,22 mg β-Zellmasse). Homozygote Mäuse mit C57BL/6J-Hintergrund erreichten letztlich eine etwa 10-fach größere β-Zellmasse als heterozygote Kontrolltiere (Abb. 3.5A). Bezüglich des Verhältnisses von β-Zellmasse zu Körpergewicht konnten zwischen beiden db/db-Mausstämmen sowohl im Alter von 8 Wochen (BKS:  $0,09 \pm 0,03$  vs. B6:  $0,15 \pm 0,02$  mg  $\beta$ -Zellmasse/kg Körpergewicht) als auch im Alter von 12 Wochen (BKS: 0,07  $\pm$  0,03 vs. B6: 0,21  $\pm$  0,10 mg  $\beta$ -Zellmasse/ kg Körpergewicht) signifikante Unterschiede festgestellt werden (Abb. 3.5B).

Um zu untersuchen, ob die kontinuierlich ansteigende  $\beta$ -Zellmasse der db/db B6-Mäuse vorrangig für die adäquate Kompensierung des erhöhten Insulinbedarfs verantwortlich ist, wurde zusätzlich das Verhältnis von basalem Plasmainsulin zu vorhandener  $\beta$ -Zellmasse ermittelt. Angesichts dessen wurde offensichtlich, dass sich beide db/db-Mausstämme in ihrer basalen Insulinsekretionskapazität pro  $\beta$ -Zell-"Einheit" weder zu db/+-Kontrolltieren noch im Vergleich zueinander signifikant unterschieden. Lediglich im Alter von 10 Wochen zeigten db/db BKS-Mäuse eine tendenziell geringere Insulinausschüttung als gleichaltrige db/db B6-Mäuse (BKS: 0,87 ± 0,56 vs. B6: 2,38 ± 1,46 ng/ml Plasmainsulin/mg  $\beta$ -Zellmasse; p = 0,15; Abb. 3.5C). Anhand der immunhistochemischen Insulin- und Glukagonfärbungen der jeweiligen Pankreasschnitte wurden die beschriebenen Differenzen zwischen den beiden db/db-Mausstämmen auch in der unterschiedlichen Morphologie der Langerhansinseln deutlich sichtbar (Abb. 3.6).



<u>Abb. 3.6</u>: Immunhistochemische Färbung pankreatischer  $\beta$ - und  $\alpha$ -Zellen von db/db-Mäusen im Alter von 7 (A) und 12 Wochen (B). Dargestellt sind repräsentative Pankreasschnitte von 7 bzw. 12

Wochen alten db/db-Mäusen mit einem C57BL/6J- (B6) bzw. C57BLKS/J- (BKS)-Hintergrund in einer 200-fachen Vergrößerung. Insulin- und glukagonproduzierende β- bzw. α-Zellen sind braun gefärbt.

Während nicht-diabetische db/db B6-Mäuse auch noch im Alter von 12 Wochen eine normale Inselmorphologie mit einem größer gewordenen Anteil insulinproduzierender  $\beta$ -Zellen aufwiesen, spiegelte sich bei db/db BKS-Mäusen die Entwicklung eines Typ-2-Diabetes mellitus in den damit assoziierten, morphologischen Veränderungen wider. Als Charakteristika der degenerierten Inseln konnte neben einer vermehrten Degranulation der  $\beta$ -Zellen und einem Verlust der klaren Inselabgrenzung auch die zunehmende Lokalisationsänderung der glukagonproduzierenden  $\alpha$ -Zellen von der Peripherie ins Innere der Inseln beobachtet werden (Abb. 3.6B).

Parallel zur immunhistochemischen Quantifizierung der  $\beta$ -Zellmasse wurde von denselben Tieren die  $\alpha$ -Zellmasse sowie deren Verhältnis zum Körpergewicht ermittelt (Abb. 3.6; Abb. 3.7). Wie in Abbildung 3.7A erkennbar, war auch die durchschnittliche  $\alpha$ -Zellmasse der beiden db/db-Mausstämme um einen Faktor von 3,5 (db/db B6) bzw. 2,8 (db/db BKS) größer als die physiologische  $\alpha$ -Zellmasse (db/+) und zeigte über den gesamten Zeitraum von 7 bis 12 Wochen einen relativ konstanten Verlauf. Trotz des starken Anstiegs der  $\alpha$ -Zellmasse von 12 Wochen alten db/db BKS-Mäusen gab es zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den homozygoten db/db-Mausstämmen (Abb. 3.6; Abb. 3.7A). Das gleiche Ergebnis konnte auch hinsichtlich des Verhältnisses von  $\alpha$ -Zellmasse zu Körpergewicht festgestellt werden, das bei allen Mausgruppen bis zu einem Alter von 10 Wochen kontinuierlich abfiel (Abb. 3.7B). Selbst aus dem direkten Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe der db/+-Mäuse resultierte diesbezüglich zu keinem Zeitpunkt ein statistischer Unterschied.



<u>Abb. 3.7</u>: Altersabhängiger Verlauf der α-Zellmasse (A) und deren Verhältnis zum Körpergewicht (B) von db/db B6-, db/db BKS- und db/+-Mäusen. Die einzelnen Parameter wurden im Alter von 7, 8, 10 und 12 Wochen bestimmt. Angegeben sind pro Zeitpunkt die Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen von mindestens 4 db/db B6-Mäusen, mindestens 3 db/db BKS-Mäusen und mindestens 2 heterozygoten (db/+ B6 und db/+ BKS gemischt) Kontrollmäusen.

# 3.1.6 In vivo-Bestimmung von β-Zellproliferation und Apoptose endokriner Zellen von db/db-Mäusen mit C57BL/6J- und C57BLKS/J-Hintergrund

Im adulten Pankreas spielen sowohl die Entstehung neuer  $\beta$ -Zellen durch Proliferation bereits existierender  $\beta$ -Zellen als auch deren Apoptose eine bedeutsame Rolle in der Größenregulation der  $\beta$ -Zellmasse (Bonner-Weir, 2000a; Dor *et al.*, 2004). Da wir zeigen konnten, dass sich die  $\beta$ -Zellmasse der beiden

untersuchten db/db-Mausstämme unterschiedlich entwickelt, war es von Interesse aufzuklären, inwiefern proliferative und apoptotische Veränderungen an der unterschiedlichen Anpassungskapazität der db/db B6- und db/db BKS-Mäuse beteiligt sind (Butler *et al.*, 2003; Rahier *et al.*, 2008; de Koning *et al.*, 2008). Zu diesem Zweck wurde zunächst die prozentuale *in vivo*-Proliferationsrate von  $\beta$ -Zellen mit Hilfe des Nukleosidanalogons BrdU und einer anschließenden Immunfluoreszenzdoppelfärbung des Pankreasgewebes gegen Insulin und BrdU ermittelt (Abb. 3.8). Aufgrund der im direkten Vergleich mit anderen Zelltypen (z.B. Hepatozyten, Enterozyten) geringen Proliferationskapazität von  $\beta$ -Zellen wurde die dafür notwendige BrdU-Inkubation von den üblichen 6 bis 9 Stunden auf eine Dauer von einer Woche ausgedehnt (Brockenbrough *et al.*, 1988).



<u>Abb. 3.8</u>: *In vivo*-Proliferationskurve der  $\beta$ -Zellen von db/db B6-, db/db BKS- und db/+-Mäusen (A) und Immunfluoreszenzfärbung repräsentativer db/db B6-Pankreasschnitte (B; C). Für die
Bestimmung der *in vivo*-Proliferation von  $\beta$ -Zellen in einem Alter von 7 bis 12 Wochen wurde den jeweiligen Mäusen für eine Woche der Proliferationsmarker BrdU (100 mg/ml) mit dem Trinkwasser zugeführt. Unmittelbar danach erfolgten Pankreaspräparation, Immunfluoreszenzfärbung und prozentuale Bestimmung der proliferierenden  $\beta$ -Zellen. (A) Angegeben sind die Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen der prozentualen  $\beta$ -Zellproliferation von mindestens 3 Tieren der beiden homozygoten db/db-Gruppen und mindestens 2 Tieren der heterozygoten (db/+ B6 und db/+ BKS gemischt) Vergleichsmäuse pro Zeitpunkt. Die unter Anwendung des t-Tests ermittelten statistischen Signifikanzen (p < 0,05) sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet und beziehen sich ausschließlich auf Differenzen zwischen den beiden homozygoten Mausstämmen (db/db B6 und db/db BKS). (B, C) Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von Pankreasinseln einer db/db B6-Maus im Alter von 7 Wochen (B) bzw. 12 Wochen (C) nach Doppelfärbung mit Insulin-Cy2 und BrdU-Cy3 (400-fache Vergrößerung).

Im Vergleich zu den physiologischen Werten der normoglykämischen db/+-Mäuse, welche einen proliferierenden  $\beta$ -Zellanteil von maximal 4,21 ± 0,99 % aufwiesen, zeigten db/db-Mäuse über den gesamten Bestimmungszeitraum eine stärkere  $\beta$ -Zell-proliferation. Dies wurde in einer 4,6- bzw. 3,8-fach größeren Proliferationsrate 7 Wochen alter db/db B6- bzw. db/db BKS-Mäuse deutlich. Beide db/db-Mausstämme besaßen zu diesem Zeitpunkt den höchsten Anteil proliferierender  $\beta$ -Zellen, der im weiteren Verlauf altersabhängig abnahm. Während bei db/db-Mäusen mit C57BLKS/J-Hintergrund die Anzahl BrdU-positiver  $\beta$ -Zellen im Alter zwischen 7 und 10 Wochen um 77,9 % vermindert wurde (16,14 ± 5,39 % auf 3,57 ± 0,90 %), verlief die Reduktion der generell stärker proliferierenden db/db B6-Mäuse mit 48,1 % wesentlich langsamer (19,54 ± 2,52 % auf 10,14 ± 3,21 %). Im Alter von 10 und 12 Wochen erreichten die Unterschiede der prozentualen Proliferationsraten der  $\beta$ -Zellen von db/db B6- und db/db BKS-Mäusen statistische Signifikanz (Abb. 3.8A). Homozygote Mäuse mit C57BLKS/J-Hintergrund proliferierenden in diesem Alter bereits auf einem ähnlich niedrigen Niveau wie heterozygote Kontrolltiere.

Zur Klärung der Frage, ob der beobachtete Unterschied in der β-Zellmasse zwischen db/db B6- und db/db BKS-Mäusen auch das Resultat unterschiedlicher Apoptoseraten ist, wurden 7 bis 12 Wochen alte db/db-Mäuse zur Quantifizierung apoptotischer Inselzellen herangezogen. Eine zusätzliche Insulinfärbung der mit Hilfe einer TUNEL-Färbung detektierten, apoptotischen Inselzellen erfolgte dabei aufgrund der methodischen Schwierigkeiten bei der Erfassung apoptotischer Zellen und der extrem niedrigen Anzahl überhaupt nachweisbarer Apoptosen nicht. Da sich bei

Mäusen der Großteil aller β-Zellen im Zentrum der Pankreasinseln befindet, wurde die äußerste Zellage der Inseln von der Auswertung ausgeschlossen (Abb. 3.9).



Abb. 3.9: *In vivo*-Apoptose endokriner Pankreaszellen von db/db B6-, db/db BKS- und db/+-Mäusen im Alter zwischen 7 und 12 Wochen (A) sowie eine repräsentative TUNEL-Färbung einer db/db BKS-Pankreasinsel (B). Für die Bestimmung der *in vivo*-Apoptose von  $\beta$ -Zellen wurden Pankreasschnitte 7, 8, 10 und 12 Wochen alter db/db B6-, db/db BKS- und db/+-Mäuse TUNEL-gefärbt und anschließend die jeweilige Anzahl TUNEL-positiver, endokriner Zellen bestimmt. (A) Angegeben sind die Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen aller auf 100 Inselquerschnitte bezogenen TUNEL-positiven Zellen von mindestens 9 Tieren der beiden homozygoten db/db-Gruppen und 5 heterozygoten (db/+ B6 und db/+ BKS gemischt) Vergleichsmäusen. Die unter Anwendung des t-Tests ermittelten statistischen Signifikanzen (p < 0,05) sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. (B) Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahme einer TUNEL-gefärbten db/db BKS-Pankreasinsel in einer 400-fachen Vergrößerung. Die TUNEL-positive  $\beta$ -Zelle ist mit einem Pfeil markiert und zusätzlich in einer 1000-fachen Vergrößerung dargestellt.

Wie in Abbildung 3.9 erkennbar, besaßen die diabetesresistenten db/db B6-Mäuse im Alter von 7 bis 12 Wochen ähnliche Apoptoseraten der endokrinen Zellen wie heterozygote db/+-Mäuse. Im Gegensatz dazu zeigten die diabetessuszeptiblen db/db BKS-Mäuse eine stärkere Apoptose und unterschieden sich über den gesamten Untersuchungszeitraum mit einer etwa 4,5-fach höheren Apoptoserate signifikant von gleichaltrigen db/db B6-Artgenossen (Abb. 3.9). Obwohl db/db BKS-Mäuse dabei bereits im prädiabetischen Alter von 7 und 8 Wochen eine höhere Anzahl apoptotischer Inselzellen aufwiesen (BKS vs. B6: 5,78 ± 4,22 vs. 1,32 ± 1,57 TUNEL-positive Inselzellen pro 100 Inselquerschnitte; p = 0,12), wurden die Differenzen erst im Alter von 10 und 12 Wochen besonders deutlich (BKS vs. B6:

8,66 ± 4,58 vs. 2,12 ± 3,73 TUNEL-positive Inselzellen pro 100 Inselquerschnitte; p = 0,03).

# 3.2 Molekulare Aspekte der β-Zelldysfunktion in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus

#### 3.2.1 Screening geeigneter Kandidatengene

Wie bereits im Abschnitt 1.4 ausführlicher dargestellt, entwickelt sich sowohl beim Menschen als auch bei Nagetieren im Verlauf der Schwangerschaft eine Insulinresistenz der peripheren Gewebe. Die dadurch bedingte Erhöhung des Insulinbedarfs wird unter physiologischen Bedingungen durch eine Verbesserung der  $\beta$ -Zellfunktion sowie eine Expansion der  $\beta$ -Zellmasse kompensiert (Parsons *et al.*, 1992). Diese Anpassungsvorgänge sind entgegengesetzt zu den Vorgängen, welche für die Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus charakteristisch sind (Prentki & Nolan, 2006). Aus diesem Grund war es unsere Hypothese, dass während der Schwangerschaft an der Kompensierung beteiligte Regulatorproteine auch mögliche Ansatzpunkte zur pharmakologischen Therapie der pathologischen Inselveränderungen bei Typ-2-Diabetikern darstellen. Um neue, für die  $\beta$ -Zellen regulatorisch bedeutsame Gene/Proteine zu identifizieren, wurde deshalb der in Abschnitt 3.2.1.1 beschriebene Ansatz eines vergleichenden Expressionsprofils der endokrinen Pankreata trächtiger und nicht-trächtiger Mäuse als Ausgangspunkt verwendet.

# 3.2.1.1 Expressionsprofil von Pankreasinseln nicht-trächtiger und trächtiger C57BL/6-Mäuse

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Kandidatengene wurden zuvor aus den Ergebnissen eines Microarray-Experiments ausgewählt. Für dieses erfolgten nach Standardprotokollen Inselpräparationen von drei trächtigen C57BL/6-Mäusen und drei gleichaltrigen, nicht-trächtigen C57BL/6-Weibchen. Da zwischen Tag 12 und 14 der dreiwöchigen murinen Schwangerschaft aufgrund einer 10-fach gesteigerten Proliferation der  $\beta$ -Zellen die stärkste  $\beta$ -Zellexpansion stattfindet, wurden die trächtigen Tiere am Tag 12,5 der Schwangerschaft untersucht (Parsons *et al.*, 1992). Die dafür aus den Inseln isolierte RNA wurde nach entsprechender Vorbehandlung

(Amplifizierung durch zwei Zyklen einer linearen Amplifizierung und Biotinylierung) separat auf Affymetrix MOE430A-Chips hybridisiert. Anschließend erfolgte die statistische Auswertung der daraus resultierenden Hybridisierungsdaten. Dabei zeigte sich im direkten Vergleich nicht-trächtiger und trächtiger C57BL/6-Weibchen. dass lediglich 400 von etwa 22.000 verschiedenen Genen der Langerhans'schen Inseln am Tag 12,5 der Schwangerschaft eine signifikante Expressionsänderung aufwiesen. Neben einer großen Anzahl direkt am Zellzyklus und an der DNA-Replikation beteiligter Gene wurden in der Schwangerschaft auch einige Gene signifikant reguliert, die für extra- oder intrazelluläre Signalproteine, Transkriptionsfaktoren oder Oberflächenrezeptoren kodieren. Da diese interessante Kandidaten hinsichtlich einer molekularen Regulatorfunktion der pankreatischen β-Zellen darstellen, wurden davon für weitere Untersuchungen sieben Gene ausgewählt, deren Funktion in den Pankreasinseln bzw. in den pankreatischen β-Zellen noch unbekannt war. Diese kodieren für folgende Proteine: ZNRF2 ("zinc and ring finger 2"), 1110008P14RIK ("RIKEN cDNA 1110008P14 gene", im Folgenden mit RIK bezeichnet), COMMD7 ("COMM domain containing 7"), ENY2 ("enhancer of yellow 2 homolog"), TCF25 ("transcription factor 25"), SOCS2 ("suppressor of cytokine signaling 2") und OPG (Osteoprotegerin), das am Tag 12,5 der Schwangerschaft mit einer 3,7-fach höheren Expressionsrate den größten Expressionsunterschied aller ausgewählten Gene zeigte. Während die Expression der Proteine ZNRF2 (2,1-fach), COMMD7 (1,6-fach), RIK (2,0-fach), ENY2 (1,8-fach) und SOCS2 (2,0-fach) ebenfalls in der Schwangerschaft signifikant hochreguliert war, zeigte TCF25 eine signifikante, 2,2-fache Herabregulation seiner Genexpression im Vergleich zu nichtträchtigen Kontrolltieren (Lechner A., unveröffentlicht).

## 3.2.1.2 Expressionsnachweis der Kandidatenproteine ZNRF2, RIK, COMMD7, ENY2, TCF25, SOCS2 und OPG in Ins-1E, MIN6 und C57BL/6-Mausinseln

Zu Beginn der Versuche wurde zunächst mit Hilfe einer semi-quantitativen RT-PCR untersucht, ob die Expression der ausgewählten Kandidatengene auch in den Insulinomzelllinien Ins-1E (Ratte) und MIN6 (Maus) stattfindet. Des Weiteren sollte deren Expressionsnachweis an primären Pankreasinseln weiblicher und männlicher C57BL/6-Mäuse bestätigt und die Expression der OPG-Liganden RANKL und TRAIL

sowie die der jeweiligen Rezeptoren RANK und TRAIL-R2 zusätzlich untersucht werden (Hsu *et al.*, 1999; Diehl *et al.*, 2004). Zu diesem Zweck wurde jeweils die Gesamt-RNA isoliert, mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und nach PCR-Amplifikation im Agarosegel detektiert (Abb. 3.10). Von allen Proben wurde jeweils eine Negativkontrolle mitgeführt (Daten nicht gezeigt) und die Sequenzspezifität der amplifizierten PCR-Produkte durch Sequenzierung bestätigt.





Es konnte sowohl in primären Inseln als auch in den verwendeten β-Zelllinien die Transkription der Proteine ZNRF2, RIK, COMMD7, ENY2, TCF25, SOCS2 und OPG aufgezeigt werden. Die Expression des OPG-Liganden RANKL konnte im Gegensatz zu dessen Rezeptor RANK nicht nachgewiesen werden. Der zweite OPG-Ligand TRAIL sowie dessen Rezeptor TRAIL-R2 wird ebenso in Ins-1E-Zellen, MIN6-Zellen und C57BL/6-Pankreasinseln transkripiert (Ausnahme: TRAIL-R2 in Ins-1E; Abb. 3.10). Um die Funktionsfähigkeit der verwendeten RANKL-Primer und der RANKL-spezifischen PCR-Programme zu bestätigen, wurde zur Positivkontrolle cDNA muriner Lymphknoten als Template mitbenutzt (Abb. 3.14).

## 3.2.2 Konstruktion geeigneter Überexpressionsvektoren

Um die physiologische Funktion der Proteine ZNRF2, RIK, COMMD7, ENY2, TCF25, SOCS2 und OPG in den β-Zellen der Bauchspeicheldrüse testen zu können, wurden für in vitro-Versuche entsprechende Überexpressionsvektoren konstruiert, in denen jeweils die vollständige, genkodierende Sequenz (CDS) der Zielproteine unmittelbar "downstream" eines konstitutiven Promotors (CMV) integriert wurde. Da für einige der zu analysierenden Proteine noch keine geeigneten Antikörper existierten, wurden zusätzlich für Detektionszwecke Vektoren konstruiert, in denen die Zielgene (mit Ausnahme von OPG) carboxyterminal mit einem HA-Tag fusioniert sind (s. Abschnitt 2.2.1.14). Die Vollständigkeit und Korrektheit aller klonierten Sequenzen wurde durch Sequenzierung mit verschiedenen Primern bestätigt. Lediglich die Klonierung von ZNRF2 konnte nicht verwirklicht werden (keine Beschaffung eines geeigneten Templates mit vollständiger "coding sequence" möglich), weshalb znrf2 von der Liste der Kandidatengene gestrichen und in der vorliegenden Arbeit nicht weiter analysiert wurde. Im Rahmen der Klonierung von OPG traten außerdem im Vergleich der in Genbanken veröffentlichten OPG-Konsensussequenzen zwei Nukleotidabweichungen unbekannten Ursprungs innerhalb der CDS von OPG auf, welche durch eine zielgerichtete Mutagenese wieder korrigiert werden konnten (jeweils Austausch eines Guanin in ein Tymidin an CDS-Position 862 bzw. 887).

Die Expressionsfähigkeit der klonierten Gene wurde in Ins-1E-Zellen nach transienter Transfektion der jeweiligen Überexpressionsplasmide (mit HA-Tag) und unterschiedlichen Inkubationszeiten durch einen Western-Blot mit anti-HA-Antikörpern bzw. im Fall von pcDNA3-OPG mit anti-OPG-Antikörpern getestet. Dabei konnte mit Ausnahme von ENY2-HA (13 kDa) die Expression aller Proteine nachgewiesen werden. Da das zeitliche Expressionsmuster der Proteine COMMD7 (22,7 kDa), TCF25 (70,9 kDa) und ENY2 (10,5 kDa) dem von SOCS2 (22,4 kDa) entsprach, ist in Abbildung 3.11 repräsentativ für alle Proteine die zeitabhängige Expression von SOCS2-HA (23,9 kDa) dargestellt.



<u>Abb. 3.11</u>: Repräsentatives Luminogramm einer Western-Blot-Analyse transient transfizierter Ins-1E-Zellen nach immunologischer Detektion mit anti-HA- und anti-β-Aktin-Antikörpern. Ins-1E-Zellen wurden jeweils transient mit dem Vektor pcDNA3 (= K; Kontrolle) bzw. pcDNA3-SOCS2-HA (= SOCS2-HA) transfiziert. Nach 24 h, 48 h, 72 h bzw. 96 h Inkubation in serumhaltigem Medium erfolgte die Extraktion und Präparation der Proteine, deren elektrophoretische Auftrennung im SDS-PAGE-Gel sowie deren Blot und immunologische Detektion unter Benutzung von anti-HA- und anti-β-Aktin-Antikörpern.

Generell konnte im Western-Blot eine zeitabhängige Zunahme der überexprimierten Proteine gezeigt werden, die 72 h nach Transfektion ihre stärkste Konzentration in Ins-1E-Zellen aufwiesen (Abb. 3.11).

# 3.2.3 *In vitro*-Proliferationsanalyse von COMMD7, RIK, ENY2, TCF25, SOCS2 und OPG in verschiedenen Tumorzelllinien

Eine erhöhte Proliferation der  $\beta$ -Zellen zählt zu den wichtigen kompensatorischen Mechanismen in einer Schwangerschaft und auch, wie in Abschnitt 3.1.6 an db/db B6-Mäusen gezeigt, einer Diabetesresistenz (Parsons *et al.*, 1992). Um zu testen, inwiefern die Proteine COMMD7, RIK, ENY2, TCF25, SOCS2 und OPG an der Regulation der Proliferation von  $\beta$ -Zellen beteiligt sind, wurden die Insulinomzelllinien Ins-1E und MIN6 transient mit den jeweiligen Überexpressionsplasmiden transfiziert. Um einen Nebeneffekt des HA-Tags auszuschließen, wurden in diesen und allen folgenden Versuchen ausschließlich die Vektoren ohne HA-Tag verwendet. Da der Großteil der zu untersuchenden Proteine nach drei Tagen die stärkste Expression in den transfizierten Zellen zeigte (s. Abschnitt 3.2.2), wurde deren Wirkung auf die Zellproliferation 24 h später, d.h. nach insgesamt 96 h Inkubation mit Hilfe eines MTT-Assays bestimmt (Abb. 3.12).





Wie in Abbildung 3.12 erkennbar ist, bewirkte eine Überexpression von COMMD7 nach einer 96-stündigen Proliferationsdauer in Ins-1E- (73,90  $\pm$  14,64 %) bzw. MIN6-Insulinomzellen (84,05  $\pm$  10,51 %) eine signifikante bzw. tendenzielle Reduktion der Zellen. Ein ähnlich antiproliferativer Effekt konnte in Ins-1E-Zellen durch eine Überexpression von ENY2 erzielt werden (69,52  $\pm$  6,64 %). Während Ins-1E-Zellen nach einer transienten Transfektion mit pcDNA3-OPG eine signifikant verstärkte Vitalität zeigten (126,19  $\pm$  16,58 %), war in OPG-überexprimierten MIN6-Zellen ebenso wie in RIK-, TCF25- und SOCS2-überexprimierten Zellen kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen nachweisbar.

Um zu testen, ob der antiproliferative Effekt von COMMD7 und ENY2 nur in Insulinomzellen auftritt oder generell tumorspezifisch ist, wurde das gleiche Experiment mit anderen Tumorzelllinien wiederholt (Abb. 3.13). Wie in Abbildung 3.13 dargestellt, wurden dafür LNCaP-(humanes Prostatakarzinom), HeLa- (humanes Zervixkarzinom), AAV293- (humanes, embryonales Nierenepithel) und BON1-Zellen (humanes, pankreatisches Karzinoid) mit den entsprechenden Vektoren transient transfiziert und nach 96 h Inkubationszeit im MTT-Assay auf ihre Proliferationsrate untersucht.



<u>Abb. 3.13</u>: MTT-Assay plasmidtransfizierter BON1- (A), HeLa- (B), AAV293- (C) und LNCaP-Zellen (D) nach 96-stündiger Inkubation. Die verschiedenen Tumorzelllinien wurden jeweils transient mit dem Vektor pcDNA3 (= Kontrolle), pcDNA3-Commd7 bzw. pcDNA3-Eny2 transfiziert und nach 96 h Inkubation für einen MTT-Proliferationsassay verwendet. Angegeben sind die Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen der mindestens aus 3 unabhängigen Versuchen berechneten, prozentualen Vitalität der Tumorzellen. Die unter Anwendung des paarweise durchgeführten t-Tests ermittelten statistischen Signifikanzen (p < 0,01) sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet und beziehen sich jeweils auf die mit dem Leervektor pcDNA3 transfizierten Kontrollzellen. Der jeweilige Effekt der beiden Proteine COMMD7 und ENY2 trat in den anderen vier untersuchten, nicht-insulinomen Tumorzelllinien nicht auf (Abb. 3.13). Da dadurch eine generelle Tumorsuppressorfunktion der beiden Proteine nicht nachgewiesen werden konnte, scheint eine zunächst vermutete,  $\beta$ -zellspezifische Regulatorfunktion wahrscheinlicher. Die weitere funktionelle Untersuchung dieser Kandidatengene war zentraler Gegenstand einer anderen Dissertation innerhalb unserer Arbeitsgruppe und wird deshalb hier nicht mehr dargestellt. Die vorliegende Arbeit fokussierte sich stattdessen auf die Proteine OPG (Abschnitt 3.2.4) und SOCS2 (Abschnitt 3.2.5).

 3.2.4 Analyse der physiologischen Funktion von Osteoprotegerin in den pankreatischen β-Zellen

#### 3.2.4.1 Endogene Expression von OPG in trächtigen C57BL/6-Mäusen

Zu Beginn der Untersuchungen sollte zunächst das Microarray-Ergebnis (s. Abschnitt 3.2.1.1), die während einer Schwangerschaft in pankreatischen Mausinseln deutlich hochregulierte OPG-Expression, mittels einer semi-quantitativen RT-PCR verifiziert werden (Abb. 3.14). Zu diesem Zweck wurde jeweils von drei trächtigen C57BL/6-Mäusen (Tag 12,5) und drei nicht-trächtigen Kontrolltieren die Gesamt-RNA aus den pankreatischen Inseln isoliert, mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und nach GAPDH-Normalisierung mit verschiedenen Primern und entsprechenden Negativkontrollen (nicht gezeigt) durch PCR amplifiziert. Die korrekte Identität der amplifizierten PCR-Produkte konnte durch eine anschließende Sequenzierung bestätigt werden. Während die OPG-Expression in Pankreasinseln trächtiger C57BL/6-Mäuse deutlich erhöht war, blieb die seines Liganden TRAIL unverändert. Eine Expression des OPG-Liganden RANKL konnte wie in Abbildung 3.10 bereits erwähnt trotz Positivkontrolle (Lymphknoten-cDNA) auch hier nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.14) (Kong *et al.*, 1999).





Da insulinproduzierende  $\beta$ -Zellen während der Schwangerschaft dynamischen Veränderungen ausgesetzt sind, stellte sich die Frage nach dem diesbezüglichen Expressionsverlauf des am Tag 12,5 der Schwangerschaft signifikant hochregulierten Proteins OPG. Deshalb wurden Pankreata weiblicher C57BL/6-Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten während sowie unmittelbar nach der Schwangerschaft (post partum) isoliert und einer Immunfluoreszenzdoppelfärbung für Insulin und OPG unterzogen. Das daraus resultierende zeitliche Expressionsmuster ist in Abbildung 3.15 anhand repräsentativer Pankreasinseln dargestellt. Es zeigt, dass die OPG-Expression in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen bis zum Tag 17,5 der Schwangerschaft deutlich ansteigt und unmittelbar nach der Geburt wieder auf das Ausgangsniveau absinkt. Demnach besteht eine starke zeitliche Korrelation mit den kompensatorischen Veränderungen von  $\beta$ -Zellmasse und  $\beta$ -Zellsekretionskapazität, welche die Hypothese einer positiven Regulatorfunktion von OPG in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen bekräftigt (Abb. 3.15; Abb. 1.4).



<u>Abb. 3.15</u>: Insulin- und OPG-Immunfluoreszenzfärbungen repräsentativer C57BL/6-Pankreasschnitte während und unmittelbar nach einer Schwangerschaft (pp). Von C57BL/6-Weibchen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten während (Tag 12,5 und 17,5) sowie in den unmittelbaren Tagen nach der Schwangerschaft (Tag 1pp, 4pp und 7pp; post partum) das Pankreas isoliert. Nach entsprechender Präparation erfolgte eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit Insulin-Cy2 (grün) und OPG-Cy3 (rot). Dargestellt sind repräsentative Pankreasinseln in einer 200-fachen Vergrößerung. Alle Belichtungszeiten sind identisch. Als Kontrolle dienten gleichaltrige, nicht-trächtige C57BL/6-Weibchen.

Um festzustellen, ob die in den insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen nachgewiesene OPG-Expression auch in anderen Zellen des endokrinen Pankreas stattfindet, wurde die OPG-Expression zusätzlich in den glukagonsezernierenden  $\alpha$ -Zellen untersucht. Zu diesem Zweck erfolgte an Pankreasgeweben trächtiger C57BL/6-Mäuse (Tag 17,5, da die OPG-Expression zu diesem Zeitpunkt am stärksten; s. Abb. 3.15) eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung für Glukagon und OPG (Abb. 3.16).



<u>Abb. 3.16</u>: Repräsentative Pankreasschnitte einer trächtigen C57BL/6-Maus nach Immunfluoreszenzdoppelfärbung gegen Glukagon und OPG (A) bzw. Insulin und OPG (B). Von trächtigen C57BL/6-Weibchen wurde am Tag 17,5 der Schwangerschaft das Pankreas isoliert, entsprechend

präpariert und anschließend einer Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit (A) OPG-Cy3 (rot) und Glukagon-Cy2 (grün) bzw. (B) OPG-Cy3 (rot) und Insulin-Cy2 (grün) unterzogen. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Pankreasinsel in einer 400-fachen Vergrößerung.

Wie in Abbildung 3.16 verdeutlicht, findet die Expression von OPG spezifisch in den zentral gelegenen, insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen statt. Eine OPG-Expression in den glukagonproduzierenden  $\alpha$ -Zellen an der Peripherie der Langerhans´schen Inseln konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.16).

### 3.2.4.2 Nachweis der Überexpression von OPG und Test einer OPG-Suppression durch RNA-Interferenz in Ins-1E-Zellen

Zur *in vitro*-Untersuchung der physiologischen Rolle von OPG in den pankreatischen β-Zellen diente vorwiegend die insulinproduzierende Ratteninsulinomzelllinie Ins-1E. Die Optimierung transienter Transfektionen wurde grundsätzlich durch Transfektion des konstitutiv GFP-exprimierenden Vektors pEGFP-N1 und der anschließenden Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Die dabei gezeigte Transfektionseffizienz der Ins-1E-Zellen betrug ähnlich der von MIN6-Zellen maximal 50 % und war zum Teil beträchtlichen Schwankungen ausgesetzt. Um eine konstante OPG-Expression in den Versuchen zu gewährleisten, wurden zusätzlich stabil transfizierte Ins-1E-OPG-Zelllinien hergestellt (s. Abschnitt 2.3.3.1). Die Selektion der ausgewählten Einzelklone fand mit Hilfe einer semi-quantitativen RT-PCR und einer Sequenzierung der daraus resultierenden PCR-Produkte statt. Für die in späteren Versuchen benutzen stabilen Ins-1E-OPG-Zelllinien wurden von den in Abbildung 3.17 dargestellten Klonen die Nummern 4 und 6 verwendet.



<u>Abb. 3.17</u>: Expressionsnachweis von exogenem OPG in verschiedenen potentiell stabil transfizierten Ins-1E-Klonen mittels semi-quantitativer RT-PCR. Als Template für die PCR-Reaktion wurde die mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschriebene RNA der potentiell stabil mit pcDNA3-OPG transfizierten Ins-1E-Klone (1 bis 11) verwendet. Die Normalisierung erfolgte mit Hilfe des "house-keeping"-Gens *gapdh*. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und nach Interkalation von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Die Expression von OPG in Ins-1E-Zellen wurde sowohl in unbehandelten Ins-1Eals auch in transient bzw. stabil pcDNA3-OPG-transfizierten Ins-1E-Zellen auf translationaler Ebene durch eine Western-Blot-Analyse mit anti-OPG-Antikörpern untersucht. Dafür wurden die Zellen 72 h in RPMI1640-Medium mit 5 % Serum inkubiert, einmal mit PBS gewaschen und anschließend weitere 24 h serumfrei kultiviert. Für die immunologische Detektion wurde das Gesamtproteinextrakt der Zellen ebenso verwendet wie die konzentrierten, im Medium befindlichen Sekretionsproteine (Abb. 3.18).



<u>Abb. 3.18</u>: Luminogramm einer Western-Blot-Analyse von Ins-1E-Zellen nach immunologischer Detektion mit anti-OPG-Antikörpern. Ins-1E-Zellen blieben entweder unbehandelt (Ins-1E) oder wurden transient mit dem Vektor pcDNA3 bzw. pcDNA3-OPG transfiziert. Zusätzlich wurden stabile Ins-1E-OPG-Zellen (Klon-4 bzw. -6) verwendet. Nach 72 h Inkubation mit 5 % Serum wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und weitere 24 h in RPMI1640-Medium ohne Serum inkubiert. Anschließend erfolgte die Proteinextraktion der lysierten Zellen (= L) und/oder die Konzentrierung der sekretierten Proteine im Medium (= K), die elektrophoretischer Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE-Gel sowie deren Blot auf eine PVDF-Membran. Für die immunologische Detektion wurden anti-OPG-Antikörper benutzt.

Im Zelllysat der endokrinen Zelllinie Ins-1E konnte nur in OPG-überexprimierenden, d.h. transient oder stabil transfizierten Zellen, eine leichte Expression von OPG nachgewiesen werden. Da die ins Kulturmedium sekretierten OPG-Proteine aufgrund des hohen Verdünnungsfaktors unterhalb der Detektionsgrenze lagen, erfolgten die letzten 24 h Inkubation in serumfreiem Medium mit einer daran anschließenden Proteinkonzentrierung über spezielle Filtersäulchen (s. Abschnitt 2.4.4). Dieses Konzentrat, welches ausschließlich Proteine mit einem Molekulargewicht von mindestens 30 kDa enthielt, wurde für die OPG-Detektion im Western-Blot verwendet. Dadurch konnte eine stärkere Expression der transient und vor allem der stabil mit pcDNA3-OPG transfizierten Ins-1E-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 3.18 erkennbar, wurden dadurch neben der verstärkten Syntheserate des monomeren OPG-Proteins (ca. 55 kDa) zusätzlich eine funktionsfähige Homodimerisierung der OPG-Monomere sowie deren Sekretionsfähigkeit bestätigt.

Um die Bedeutung von OPG in der Regulation der β-Zellen besser untersuchen zu können, sollten nicht nur mögliche Effekte einer OPG-Überexpression aufgezeigt werden, sondern auch die Konsequenzen eines Fehlens von OPG. Zu diesem Zweck wurde in Ins-1E-Zellen die Suppressionskapazität verschiedener OPG-spezifischer siRNA-Oligonukleotide getestet (Abb. 3.19).



<u>Abb. 3.19</u>: Analyse der RNA-Interferenz-vermittelten OPG-Suppression in Ins-1E-Zellen auf transkriptioneller (A) und translationaler Ebene (B). Ins-1E-Zellen wurden jeweils mit 100 nM siRNA revers transfiziert. Zum Nachweis der OPG-Suppression auf Ebene der Transkription wurde nach 72 h bzw. 96 h Inkubation die Gesamt-RNA der Zellen isoliert, mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und mittels einer semi-quantitativen RT-PCR auf die Expression von OPG untersucht. Die Normalisierung erfolgte mit Hilfe des "house-keeping"-Gens *gapdh*. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid und

UV-Licht sichtbar gemacht (A). Zum Nachweis der OPG-Suppression auf Ebene der Translation wurden die Zellen nach siRNA-Transfektion für 72 h in serumhaltigem RPMI1640-Medium inkubiert und einmal mit PBS gewaschen. Nach weiteren 24 h Inkubation ohne Serum erfolgte mit Hilfe spezieller Filtersäulchen die Konzentrierung der im Kulturmedium befindlichen Proteine (> 30 kDa) und deren immunologische Detektion im Western-Blot mit anti-OPG-Antikörpern (B). "Nonsense" siRNA (= siK), verschiedene OPG-siRNAs (= si3, si8, si65, si66, si67).

Obwohl einige OPG-siRNAs nach 72 h bzw. 96 h Inkubation auf transkriptioneller Ebene supprimierende Effekte in einer semi-quantitativen RT-PCR aufwiesen (Abb. 3.19A), konnte trotz unterschiedlicher Inkubations- und Transfektionsbedingungen (s. Abschnitt 2.3.3.2) kein konstanter Nachweis einer Suppression der OPG-Proteine auf translationaler Ebene erbracht werden (Abb. 3.19B). Dies galt für endogen exprimiertes OPG ebenso wie für überexprimiertes OPG in transfizierten Ins-1E-Zellen (letztere Daten nicht gezeigt) und kann eventuell auf eine übermäßig starke Stabilität der OPG-Proteine zurückgeführt werden.

# 3.2.4.3 Nachweis der biologischen Aktivität exogener OPG-Proteine sowie der rekombinanten OPG-Rezeptoren RANKL und TRAIL

Um die biologische Aktivität des klonierten Proteins OPG und der kommerziell erworbenen Faktoren zu testen, wurde ein Milzzelldifferenzierungsassay mit anschließender TRAP-Färbung etabliert (s. Abschnitt 2.3.9). Dieser basiert auf dem Prinzip, dass sich hämatopoetische Zellen in Gegenwart von M-CSF ("macrophage colony-stimulating factor") und RANKL ("receptor activator of NF-KB ligand") zu Osteoklasten differenzieren können (Mancino et al., 2001). Durch die Aktivität der als Differenzierungsmarker genutzten "tartrate-resistant acid phosphatase" (TRAP) zeigen diese zusätzlich zu ihrem multinukleären Phänotyp eine deutliche Rotfärbung im Vergleich zu undifferenzierten Zellen. Da OPG als "decoy"-Rezeptor für RANKL fungiert, wird die Osteoklastendifferenzierung durch OPG inhibiert (Udagawa et al., 2000), was sich im Resultat der TRAP-Färbung widerspiegelt. Für den Milzzelldifferenzierungsassay wurden aus einer C57BL/6-Maus isolierte Milzzellen für eine Woche mit einer Kombination aus M-CSF, RANKL und teilweise OPG inkubiert. Rekombinantes OPG diente als Positivkontrolle für das klonierte OPG aus dem konzentrierten Medium transient mit pcDNA3-OPG-transfizierten Ins1E-Zellen bzw. stabiler Ins1E-OPG-Zellen. In Abbildung 3.20 ist die dosisabhängige Wirkung der

rekombinanten Zytokine RANKL bzw. OPG auf die Osteoklastendifferenzierung dargestellt sowie ein repräsentative Aufnahme undifferenzierter und zu Osteoklasten differenzierter Milzzellen.

Die Differenzierung der Milzzellen zu multinukleären Osteoklasten in Gegenwart von M-CSF wurde durch RANKL dosisabhängig induziert (Abb. 3.20A). Ebenso bewirkte exogenes OPG eine dosisabhängige Inhibierung dieser Differenzierung (Abb. 3.20B). Bezüglich des in Ins-1E-Zellen überexprimierten OPG-Proteins wurde eine vergleichbare inhibitorische Wirkung auf die Differenzierung von Osteoklasten nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Letztendlich konnte dadurch neben der biologischen Aktivität des klonierten, überexprimierten OPGs auch die Funktionsfähigkeit der von R&D-Systems bezogenen, in späteren Versuchen verwendeten rekombinanten Zytokine RANKL und OPG bestätigt werden.



<u>Abb. 3.20</u>: In vitro-Test der biologischen Aktivität von RANKL und OPG in einem Milzzelldifferenzierungsassay mit anschließender TRAP-Färbung. Aus einer C57BL/6-Maus isolierte Milzzellen wurden für eine Woche mit einer Kombination aus M-CSF (25 ng/ml) und verschiedenen Konzentrationen RANKL inkubiert (A) oder M-CSF (25 ng/ml), RANKL (3 ng/ml) und verschiedenen

Konzentrationen exogenem OPG (B). Im Anschluss daran erfolgte mittels TRAP-Färbung der Differenzierungsnachweis der Milzzellen zu Osteoklasten (= TRAP-positive, multinukleäre Zellen) und deren Auswertung unter dem Durchlichtmikroskop. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen undifferenzierter Milzzellen (D) und zu Osteoklasten differenzierter Milzzellen (C) nach TRAP-Färbung in einer 400-fachen Vergrößerung.

Ein weiteres eingesetztes Zytokin war TRAIL, welches durch Bindung an bestimmte Rezeptoren speziell die Apoptose von Tumorzellen induziert (Macfarlane, 2003). Da die Ratteninsulinomzelllinie Ins-1E vermutlich aufgrund des fehlenden TRAIL-Rezeptors TRAIL-R2 resistent gegenüber einer TRAIL-induzierten Apoptose ist (Abb. 3.10), fand der Funktionsnachweis für das rekombinante TRAIL an den humanen Tumorzelllinien MCF-7 (Mammakarzinom) und HepG2 (Hepatom) statt. Dafür wurden die Zellen jeweils 24 h ohne bzw. mit TRAIL (50 ng/ml) im Kulturmedium inkubiert und anschließend im MTT-Assay auf ihre Vitalität überprüft (Abb. 3.21).



<u>Abb. 3.21</u>: MTT-Assay mit HepG2- bzw. MCF-7-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit bzw. ohne Zugabe von rekombinantem TRAIL. Die beiden Tumorzelllinien wurden jeweils 24 h ohne bzw. mit rekombinantem mouse-TRAIL (50 ng/ml) inkubiert und anschließend in einem MTT-Assay auf ihre Zellvitalität überprüft. Angegeben sind die aus einer Dreifachbestimmung berechneten Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen der prozentualen Vitalität der Zellen. Die unter Anwendung des t-Tests ermittelten statistischen Signifikanzen (p < 0,05) sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet und beziehen sich auf die ohne TRAIL-Zusatz kultivierten Kontrollzellen.

Dabei konnte sowohl in MCF-7- als auch in HepG2-Zellen durch die signifikant proapoptotische Wirkung von TRAIL dessen Funktionsfähigkeit nachgewiesen werden (Abb. 3.21).

## 3.2.4.4 In vitro-Analyse des Effektes von OPG auf die glukosestimulierte Insulinsekretion von Ins-1E- und MIN6-Zellen sowie von C57BL/6-Pankreasinseln

Zur Aufklärung der Frage, ob OPG eine physiologische Rolle in der Regulation der Insulinsekretion von pankreatischen β-Zellen spielt, wurden glukosestimulierte Insulinsekretionsversuche an den Insulinomzelllinien Ins-1E und MIN6 durchgeführt. Beide Zelllinien sind aufgrund ihrer Fähigkeit zur Produktion, Speicherung und glukoseinduzierten Ausschüttung von Insulin gleichermaßen für diesen Assay geeignet (Miyazaki et al., 1990; Asfari et al., 1992; Merglen et al., 2004). Um zusätzlich das Sekretionsverhalten von β-Zellen in einer möglichst natürlichen Umgebung zu untersuchen, wurde dieser Versuch auch an isolierten Langerhans'schen Inseln von C57BL/6-Mäusen durchgeführt. Die Insulinsekretionsversuche in Ins-1E-Zellen fanden 72 h nach transienter Transfektion mit den Vektoren pcDNA3 bzw. pcDNA3-OPG statt bzw. im Fall von MIN6-Zellen und Mausinseln nach 18-stündiger Vorinkubation mit rekombinantem mouse-OPG (100 ng/ml). Dabei wurden die Zellen jeweils in glukosefreiem Medium mit unterschiedlichen, im physiologischen Bereich von 2,8 bis einschließlich 16,7 mM (entspricht 50 bis 300 mg/dl) liegenden Glukosekonzentrationen für 30 min (Ins-1E) bzw. für 60 min (MIN6, isolierte Pankreasinseln) stimuliert. Die Detektion der im untersuchten Zeitfenster sekretierten Insulinmengen erfolgte im Anschluss mit Hilfe eines Insulin-ELISA (Abb. 3.22).



<u>Abb. 3.22</u>: Glukosestimulierte Insulinsekretion von Ins-1E- (A, B) und MIN6-Zellen (C) sowie von isolierten C57BL/6-Pankreasinseln (D). Ins-1E-Zellen wurden entweder nach transienter Trans-

fektion mit den Vektoren pcDNA3 bzw. pcDNA3-OPG für 72 h inkubiert (A) oder nach Erreichen einer geeigneten Konfluenz für 18 h mit bzw. ohne 100 ng/ml rekombinantem mouse-OPG (= OPG-Fc) inkubiert (B). Auch bei MIN6-Zellen (C) und pankreatischen C57BL/6-Inseln (D) erfolgte vor dem Insulinsekretionsassay eine 18-stündige Vorinkubation mit bzw. ohne OPG-Fc (100 ng/ml). Ins-1E-, MIN6-Zellen bzw. Pankreasinseln wurden anschließend *in vitro* für 30 min (Ins-1E) bzw. 60 min (MIN6, Pankreasinseln) mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2,8 mM, 5,6 mM, 8,4 mM, 11,2 mM bzw. 16,7 mM) stimuliert und anschließend unter Verwendung eines Insulin-ELISA auf die sekretierte Insulinmenge untersucht. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und dazugehörigen Standard-abweichungen repräsentativer, glukoseabhängiger Insulinsekretionen im untersuchten Zeitraum.

Aus Abbildung 3.22 geht hervor, dass die Menge an sekretiertem Insulin nach Glukosestimulation sowohl in Ins-1E- und MIN6-Zellen als auch in isolierten C57BL/6-Mausinseln nach Inkubation mit rekombinantem OPG tendenziell niedriger war. Im Gegensatz dazu tendierten transient plasmidtransfizierte, OPG-überexprimierende Ins-1E-Zellen zu einer verstärkten glukoseabhängigen Insulinsekretion. Signifikante Unterschiede zu den entsprechenden Kontrollen zeigten sich jedoch letztendlich mit keiner der gewählten Glukosekonzentrationen und  $\beta$ -Zellmodellen, so dass man davon ausgehen kann, dass OPG keine zentrale Funktion in der physiologischen Regulation der glukosestimulierten Insulinsekretion zukommt.

#### 3.2.4.5 *In-vitro*-Analyse des Effektes von OPG auf die Apoptose von β-Zellen

Für *in vitro*-Untersuchungen der regulatorischen Rolle von OPG bezüglich der Apoptose von  $\beta$ -Zellen wurden als Apoptoseinduktoren entweder die proapoptotischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  verwendet oder Palmitat als Repräsentant gesättigter Fettsäuren. Zunächst wurden Ins-1E-Zellen und isolierte C57BL/6-Pankreasinseln mit Hilfe einer semi-quantitativen RT-PCR auf die Expression von endogenem OPG nach einer unterschiedlich langen Stimulation mit einzelnen Zytokinen bzw. einer Kombination der genannten Zytokine untersucht (Abb. 3.23).



<u>Abb. 3.23</u>: Expressionsnachweis von endogenem OPG in Ins-1E-Zellen (A) und isolierten Mausinseln (B) nach Zytokinstimulation. Als Template für die semi-quantitative RT-PCR wurde die mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgeschriebene RNA der Ins-1E-Zellen bzw. pankreatischen Inseln von C57BL/6-Mäusen verwendet. Die Zellen bzw. Pankreasinseln wurden vor RNA-Isolation entweder für unterschiedlich lange Inkubationszeiten (1 h, 2 h, 4 h, 8 h) mit einem Zytokinmix (= ZM) aus IL-1 $\beta$  (1 ng/ml), IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) und TNF- $\alpha$  (1000 U/ml) oder für 4 h mit den jeweils einzelnen Zytokinen (selbe Konzentration wie im ZM) in serumfreiem Medium inkubiert. Als Kontrollen dienten jeweils unstimulierte Proben (= K) bzw. RT-negative PCR-Produkte (= NK). Die Normalisierung erfolgte mit Hilfe des "house-keeping"-Gens *gapdh*. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und nach Interkalation von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Dabei konnte erwartungsgemäß gezeigt werden, dass sowohl in Ins-1E-Zellen als auch in murinen Pankreasinseln die OPG-Expression durch eine Zytokinkombination aus IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  bereits nach 1 h Stimulation induziert wird und IL-1 $\beta$  ebenso wie TNF- $\alpha$  für eine alleinige Hochregulation von OPG in Ins-1E-Zellen ausreichend ist (Abb. 3.23) (Cardozo *et al.*, 2001; Schrader *et al.*, 2007).

In verschiedenen Arten von Tumorzellen konnte *in vitro* eine protektive Funktion von OPG durch kompetitive Bindung des apoptoseinduzierenden TNF-Proteins TRAIL nachgewiesen werden (Holen & Shipman, 2006). Zur Klärung der Frage, ob OPG auch pankreatische β-Zellen vor Apoptose schützen kann bzw. generell in der Regulation der Apoptose involviert ist, wurden isolierte C57BL/6-Pankreasinseln in serumfreiem Medium für 24 h mit bzw. ohne exogenem OPG und verschiedenen

Kombinationen der rekombinanten Zytokine IL-1β, IFN-γ und TNF-α inkubiert. Um zusätzlich den proapoptotischen Effekt der im Typ-2-Diabetes mellitus auftretenden Gluko- und Glukolipotoxizität zu imitieren, erfolgte diese 24-stündige Inkubation auch mit Glukose (20 mM) und/oder Palmitat (0,5 mM). Die anschließende Analyse der Pankreasinseln wurde nach deren Doppelfärbung mit Hoechst33342 und Propidium-iodid unter dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt (Abb. 3.24).

Es konnte durch einen Zytokinmix eine ähnliche Apoptoseintensität der Inseln induziert werden wie durch Inkubation mit einer hohen Konzentration an Glukose und/oder Palmitat. Die Koinkubation mit rekombinantem OPG zeigte jedoch unabhängig von der eingesetzten Konzentration (zwischen 1 und 1000 ng/ml) in keinem der Ansätze einen Effekt. Selbst in einer weniger toxisch wirkenden Einzelinkubation mit IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) oder durch längere Inkubationszeiten (48 h, 72 h, 7 Tage) konnten kaum Unterschiede zu unstimulierten Kontrollinseln erkannt werden (Daten nicht gezeigt). Problematisch bei dieser Art von Assay erwiesen sich dabei nicht nur die leicht unterschiedlichen Apoptoseraten innerhalb der verschiedenen Ansätze, sondern auch die Abschätzung der relativen Vitalität der schwer erkennbaren Einzelzellen innerhalb der gefärbten Inseln.



<u>Abb. 3.24</u>: Immunfluoreszenzaufnahmen isolierter C57BL/6-Pankreasinseln nach einer Hoechst/-Propidiumiodidfärbung. Die Inseln wurden für 24 h in serumfreiem Medium ohne Zusatz (A) bzw. mit einer Kombination aus IL-1 $\beta$  (1 ng/ml), IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) und TNF- $\alpha$  (1000 U/ml) oder

Glukose (20 mM) und/oder Palmitat (0,5 mM) inkubiert (B). Die Inkubation erfolgte zusätzlich entweder ohne oder mit Zusatz verschiedener Konzentrationen von rekombinantem OPG (1, 10, 100 bzw. 1000 ng/ml). Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen dieser Langerhans schen Inseln in einer 400-fachen Vergrößerung nach Färbung mit Hoechst33342 (blau; lebende Zellen) und Propidiumiodid (rot; abgestorbene Zellen).

Weitere *in vitro*-Untersuchungen von OPG im Rahmen der Apoptose von  $\beta$ -Zellen fanden deshalb in Ins-1E-Zellen statt. Zu diesem Zweck wurden sowohl untransfizierte Ins-1E-Zellen, transient mit pcDNA3-OPG transfizierte Ins-1E-Zellen als auch stabile Ins1E-OPG-Zellen verwendet. Nach einer 72-stündigen Inkubation in serumhaltigem Medium und einem Waschschritt mit PBS folgte jeweils eine weitere Inkubation für 24 h in serumfreiem Medium. Während dieser Zeit wurden die Zellen zur Kontrolle ohne Zusatz bzw. zur Apoptoseinduktion entweder mit Palmitat (0,5 mM), einem Zytokinmix aus IL-1 $\beta$  (100 pg/ml), IFN- $\gamma$  (100 U/ml) und TNF- $\alpha$  (100 U/ml) oder nur mit IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellvitalität unter Anwendung eines MTT-Assays. Da die jeweils verschieden transfizierten Zellen unterschiedliche Proliferationsraten besaßen und in diesem Versuchsabschnitt ausschließlich der apoptotische Effekt untersucht werden sollte, wurden die im MTT-Assay erhaltenen Werte der jeweils unstimulierten Kontrollen als 100 % definiert.

Wie in Abbildung 3.25A zu erkennen, konnte nach einer 24-stündigen Inkubation mit 0,5 mM fettsäurefreiem BSA-gebundenem Palmitat kein Unterschied in der Reduktion der Vitalität von Ins-1E- und stabilen Ins-1E-OPG-Zellen gezeigt werden. Das gleiche Ergebnis war auch in transient mit pcDNA3- bzw. pcDNA3-OPG transfizierten Ins1E-Zellen zu beobachten (Daten nicht gezeigt).



<u>Abb. 3.25</u>: MTT-Assay von Ins-1E- und stabilen Ins-1E-OPG-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Palmitat (A) bzw. IL-1 $\beta$  (B). Ins-1E- und Ins-1E-OPG-Zellen (dargestellt in B ist Klon 4) wurden jeweils nach 72 h Inkubation einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 24 h in serumfreiem Medium mit bzw. ohne Palmitat (0,5 mM; A) oder IL-1 $\beta$  (100 pg/ml; B) inkubiert. Die IL-1 $\beta$ -Stimulation fand in diesen 24 h zusätzlich mit den rekombinanten Zytokinen mouse-OPG (= OPG-Fc; 100 ng/ml), mouse-RANKL (100 ng/ml) oder mouse-TRAIL (50 ng/ml) statt. Anschließend erfolgte jeweils die Bestimmung der Zellvitalität im MTT-Assay. Angegeben sind die Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen der aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen berechneten, prozentualen Vitalität der Tumorzellen, in denen jeweils die unstimulierten Zellen als 100 % definiert sind. Die unter Anwendung des t-Tests ermittelten statistischen Signifikanzen (p < 0,05) sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet und beziehen sich jeweils auf die Werte der IL-1 $\beta$ -stimulierten Ins-1E-Kontrollzellen.

Da der proapoptotische Effekt einer 24-stündigen Inkubation mit einer Zytokinkombination aus IL-1 $\beta$  (100 pg/ml), IFN- $\gamma$  (100 U/ml) und TNF- $\alpha$  (100 U/ml) mit einer Apoptoserate von 75 bis 80 % zu dominant erschien, um mögliche Effekte von OPG nachzuweisen, wurden die Zellen in weiteren Versuchen nur mit IL-1β stimuliert. Dabei hat sich in Vorversuchen mit dosisabhängigen Stimulationen die IL-1β-Konzentration von 100 pg/ml am effektivsten für eine Apoptoseinduktion erwiesen (Daten nicht gezeigt). Während sich transient mit pcDNA3- bzw. pcDNA3-OPG transfizierte Ins-1E-Zellen nach IL-1β-Stimulation ähnlich wie palmitatstimulierte Zellen kaum in ihrer prozentualen Vitalität unterschieden (Daten nicht gezeigt), zeigten IL-1β-stimulierte Ins-1E-OPG-Zellen eine signifikant höhere Vitalität als die Kontrollzellen (Abb. 3.25B). Im Gegensatz dazu war kein Unterschied nachweisbar, wenn die IL-1β-Inkubation gleichzeitig mit exogenem OPG (100 ng/ml) stattfand (Abb. 3.25B). Dies galt auch nach einer einstündigen Vorinkubation mit exogenem OPG (Daten nicht gezeigt).

Zur Aufklärung der Frage, ob sich der protektive Effekt von OPG in stabil OPGüberexprimierenden Ins-1E-Zellen durch Interaktion mit den TNF-Liganden RANKL oder TRAIL inhibieren lässt, wurden die Zellen in den letzten 24 h zusätzlich mit rekombinantem mouse-RANKL (100 ng/ml) bzw. mouse-TRAIL (150 ng/ml) inkubiert. Wie in Abbildung 3.25B ersichtlich, konnte dabei kein Einfluss der beiden klassischen OPG-Liganden gezeigt werden. Da beide Ins-1E-OPG-Klone (4 und 6) jeweils ein ähnliches Ergebnis erzielten, wurden zur vereinfachten Darstellung der Resultate lediglich die Werte von Klon 4 herangezogen. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass OPG seinen Effekt vor Ausbildung der inhibierenden Interaktion mit RANKL bzw. TRAIL ausübt, wurden RANKL und TRAIL in einem weiteren Versuch den Zellen bereits 24 h vor IL-1β-Stimulation zugegeben. Dies hatte jedoch ebenso wie die Variation der im Überschuss eingesetzten Zytokinkonzentrationen (RANKL: 100 bis 250 ng/ml; TRAIL: 50 bis 200 ng/ml) keine Auswirkung auf die Vitalität der untersuchten Ins1E-OPG-Zellen (Daten nicht gezeigt). Da die Funktionalität von OPG in einem Vorversuch bereits nachgewiesen werden konnte (s. Abschnitt 3.2.4.3), stützen die in diesem Abschnitt erhaltenen Resultate die Hypothese, dass OPG über einen RANKL/-TRAIL-unabhängigen Mechanismus einen protektiven Effekt auf pankreatische β-Zellen ausübt.

Um sicherzustellen, dass der im MTT-Assay nach IL-1 $\beta$ -Stimulation erhaltene Effekt tatsächlich auf das Protein OPG zurückzuführen ist, wurde das Experiment unter Anwendung der RNA-Interferenz wiederholt. Die dafür notwendige Transfektion der Ins-1E-Zellen erfolgte zur Kontrolle mit einer "nonsense" siRNA sowie mit den siRNA-Nukleotiden siOPG-3 und siOPG-65, da diesen zumindest auf transkriptioneller Ebene ein Suppressionseffekt nachgewiesen werden konnte (s. Abschnitt 3.2.4.2). Die daraus resultierenden Ergebnisse erwiesen sich jedoch als widersprüchlich und gingen auch aufgrund der in Abschnitt 3.2.4.2 geschilderten Problematik nicht mit in die Auswertung ein (Daten nicht gezeigt). Da die IL-1 $\beta$ -Toleranz nur in stabil transfizierten Ins-1E-OPG-Zellen beobachtet wurde, sollte des Weiteren überprüft werden, ob dieser Effekt grundsätzlich in der Methodik der stabilen Transfektion und somit nicht im transfizierten Protein begründet sein könnte. Deshalb erfolgte eine Wiederholung der 24-stündigen Stimulation mit IL-1 $\beta$  in stabilen Ins-1E-Tcf25-Zellen (Abb. 3.26).



<u>Abb. 3.26</u>: MTT-Assay von Ins-1E- und stabilen Ins-1E-Tcf25-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit IL-1 $\beta$ . Ins-1E- und Ins-1E-Tcf25-Zellen wurden nach 72 h Inkubation einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 24 h in serumfreiem Medium mit bzw. ohne IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) inkubiert. Anschließend erfolgte jeweils die Bestimmung der Zellvitalität im MTT-Assay. Angegeben sind die Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen der berechneten, prozentualen Vitalität der Tumorzellen, in denen die unstimulierten Zellen jeweils als 100 % definiert sind. Die unter Anwendung des t-Tests ermittelten statistischen Signifikanzen (p < 0,05) sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet und beziehen sich auf die IL-1 $\beta$ -stimulierten Ins-1E-Kontrollzellen.

Das dabei erhaltene Resultat zeigte, dass IL-1 $\beta$  in der Tcf25-überexprimierenden Zelllinie Ins-1E-Tcf25 eher einen verstärkt proapoptotischen Effekt induzierte (Abb. 3.26). Aufgrund dieser Tatsache erscheint es wahrscheinlich, dass überexprimiertes OPG tatsächlich eine protektive Funktion in pankreatischen  $\beta$ -Zellen gegenüber einer IL-1 $\beta$ -vermittelten Apoptose ausübt.

### 3.2.4.6 Einfluss von OPG auf die Aktivierung der MAP-Kinasen JNK1/2, p44/42-MAPK und p38-MAPK nach IL-1β-Stimulation *in vitro*

In dieser Arbeit (s. Abschnitt 3.2.4.5) und anderen Studien konnte sowohl eine IL-1βinduzierte Hochregulation von OPG als auch eine OPG-vermittelte Schutzfunktion (Cardozo et al., 2001; Schrader et al., 2007). Des Weiteren ist bekannt, das proapoptotische Zytokine wie IL-1ß ihre Signale über die Aktivierung verschiedener Stresskinasen weiterleiten, zu denen auch die Proteine der sogenannten MAPK ("mitogen-activated protein kinases")-Familie zählen (Eizirik & Mandrup-Poulsen, 2001). Um zu klären, welche Signaltransduktionswege von OPG in den pankreatischen β-Zellen beeinflusst werden, wurden Ins-1E- und Ins-1E-OPG-Zellen für 20 min in serumfreiem Medium mit IL-1ß (100 pg/ml) stimuliert und anschließend im Western-Blot bezüglich der Aktivierung der MAPK-Proteine JNK1/2 (= "c-Jun aminoterminal kinase"), p44/42-MAPK (= ERK1/2; "extracellular signal-regulated kinase") und p38-MAPK untersucht (Abb. 3.27). Dabei spiegelt der Phosphorylierungsgrad der jeweiligen Kinasen deren Aktivierungsgrad wider. Durch die verfügbaren Antikörper für Western-Blot-Analysen wurden jeweils die Isoformen JNK1 und JNK2 (46 kDa und 54 kDa) ebenso wie die Isoformen p44 und p42 (44 kDa und 42 kDa) zusammen detektiert, während das Protein p38 (mit dem gewählten Antikörper ca. 43 kDa) als Einzelbande erscheint (Abb. 3.27; Abb. 3.28).





und elektrophoretischer Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE-Gel erfolgten deren Blot und immunologische Detektion mit anti-Phospho-JNK1/2-, anti-Phospho-p44/42-MAPK bzw. anti-Phospho-p38-MAPK-Antikörpern. Nach erstmaligem Strippen der Membranen und Detektion mit Antikörpern gegen die jeweils unphosphorylierte Form der MAPK-Proteine, wurden die Membranen erneut gestrippt und mit anti-β-Aktin-Antikörpern detektiert.

Betrachtet man die in Abbildung 3.27 dargestellten, repräsentativen Luminogramme der Western-Blot-Analysen, so wird deutlich, dass eine Überexpression von OPG in den stabilen Ins-1E-OPG-Zellen eine Reduktion der IL-1β-induzierten Aktivierung der Proteine JNK1/2, p44/42-MAPK und p38-MAPK zur Folge hat. Im Gegensatz dazu konnte diese Wirkung durch synthetisches OPG-Fc nicht erzielt werden.

Um auszuschließen, dass stabile Ins-1E-Klone *per se* Ursache der reduzierten MAPK-Aktivitäten sind, wurde dieser Assay parallel mit einem stabilen Ins-1E-Tcf25-Klon durchgeführt (Abb. 3.28).

	JNK1/2				р44/42-МАРК				р38-МАРК				
	Ins-1E		Ins-1E-Tcf25		Ins-1E		Ins-1E-Tcf25		Ins-1E		Ins-1E-Tcf25		_
	-	+	-	+	-	+	-	+		+	-	+	 IL-1β
Phospho-MAPK		1		1	=	=	=	=		-		-	
МАРК	1	1	1	1	=	=	=	=	-	-	-	-	
β-Aktin	-	-	-	-		_	_	_	-	-	-	-	à

<u>Abb. 3.28</u>: Luminogramm einer Western-Blot-Analyse von Ins-1E- und Ins-1E-Tcf25-Zellen nach immunologischer Detektion mit anti-Phospho-MAPK-, anti-MAPK- und anti- $\beta$ -Aktin-Antikörpern. Beide Ins-1E-Zelllinien wurden nach 72 h Inkubation in serumhaltigem Medium einmal mit PBS gewaschen und anschließend über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine 20-minütige Stimulation mit bzw. ohne IL-1 $\beta$  (100 pg/ml). Nach Proteinextraktion der lysierten Zellen und elektrophoretischer Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE-Gel, erfolgten deren Blot und immunologische Detektion mit anti-Phospho-JNK1/2-, anti-Phospho-p44/42-MAPK bzw. anti-Phospho-p38-MAPK-Antikörpern. Nach erstmaligem Strippen der Membranen und Detektion mit Antikörpern gegen die jeweils unphosphorylierte Form der MAPK-Proteine wurden die Membranen erneut gestrippt und mit anti- $\beta$ -Aktin-Antikörpern detektiert.

Da die Aktivierung der beiden MAPK-Isoformen p44 und p42 bereits bei kleinsten Inkubationsschwankungen oder sonstigen Änderungen induziert werden kann, erfolgte die Detektion der beiden phosphorylierten Proteine teilweise auch im unstimulierten Zustand. Wie in Abbildung 3.28 erkennbar, zeigte dennoch eine andere stabile Ins-1E-Zellinie (Ins-1E-Tcf25) nach IL-1β-Stimulation eine ähnliche Phosphorylierung der drei untersuchten MAP-Kinasen JNK1/2, p44/42-MAPK und p38-MAPK wie die Ins-1E-Kontrollzellen. Dies lässt die Folgerung zu, dass die in Abbildung 3.27 dargestellte Reduktion der IL-1β-induzierten Aktivierung der untersuchten Stresskinasen wahrscheinlich tatsächlich auf das endogen überexprimierte OPG zurückzuführen ist.

# 3.2.5 Analyse der physiologischen Funktion von SOCS2 in den pankreatischen β-Zellen

#### 3.2.5.1 Endogene Expression von SOCS2 in trächtigen C57BL/6-Mäusen

Wie durch den in Abschnitt 3.2.1.1 beschriebenen Microarray gezeigt werden konnte, findet in der Schwangerschaft eine signifikante Hochregulation des Proteins SOCS2 in den pankreatischen Inseln statt. Zur Bestätigung dieses Resultates wurde die SOCS2-Expression in isolierten Pankreasinseln trächtiger C57BL/6-Mäuse (Tag 12,5) und nicht-trächtiger C57BL/6-Kontrollmäuse mit Hilfe einer semi-quantitativen RT-PCR untersucht (Abb. 3.29). Dafür erfolgte zunächst die Isolierung der Gesamt-RNA aus den jeweiligen Pankreasinseln, deren Umschreibung in cDNA sowie die Amplifizierung von SOCS2 mit entsprechenden Primern und Negativkontrollen. Zur Normalisierung der Proben wurde das "house-keeping"-Gen *gapdh* verwendet.

Da laktogene Hormone wie Prolaktin (PRL) verstärkt während einer Schwangerschaft synthetisiert werden und SOCS-Proteine als negative Regulatoren des PRL-Signaltransduktionsweges fungieren, sollte die endogene Expression von SOCS2 zusätzlich am β-Zellmodell der Ins-1E-Zellen nach PRL-Stimulation untersucht werden (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Krebs & Hilton, 2001; Grattan *et al.*, 2008). Zu diesem Zweck wurden Ins-1E-Zellen nach Erreichen einer geeigneten Konfluenz für 24 h in serumfreiem Medium mit bzw. ohne rekombinantem PRL (300 ng/ml) stimuliert und ebenfalls unter Anwendung einer semi-quantitativen RT-PCR analysiert (Abb. 3.29).



<u>Abb. 3.29</u>: Expressionsnachweis von endogenem SOCS2 in isolierten Pankreasinseln trächtiger (Tag 12,5) und nicht-trächtiger C57BL/6-Mäuse sowie PRL-stimulierter Ins-1E-Zellen. Als Template für die semi-quantitative RT-PCR wurde die mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgeschriebene RNA pankreatischer Mausinseln bzw. aus Ins-1E-Zellen verwendet. Pankreasinseln stammten von nicht-trächtigen (= Kontrollen; K) bzw. trächtigen (=T; Tag 12,5) C57BL/6-Mäusen. Ins-1E-Zellen wurden vor RNA-Isolation für 24 h in serumfreiem Medium ohne (= K) bzw. mit rekombinantem mouse-Prolaktin (= PRL; 300 ng/ml) inkubiert. Als interne PCR-Kontrollen dienten RT-negative PCR-Produkte (= NK) und die Normalisierung mit Hilfe des "house-keeping"-Gens *gapdh.* Nach Ablauf der PCR-Reaktion mit entsprechenden Primern erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel und deren Detektion mittels Ethidiumbromid und UV-Licht.

Wie in Abbildung 3.29 ersichtlich, konnte das Ergebnis der im Verlauf einer Schwangerschaft erhöhten β-Zellexpression von endogenem SOCS2 sowohl an Pankreasinseln trächtiger C57BL/6-Mäuse als auch mit PRL-stimulierten Ins-1E-Zellen *in vitro* verifiziert werden.

#### 3.2.5.2 Nachweis der Überexpression von SOCS2 sowie einer effektiven SOCS2-Suppression durch RNA-Interferenz in Ins-1E-Zellen

Ein Großteil der *in vitro*-Analysen zur besseren Aufklärung der biologischen Funktion von SOCS2 in den β-Zellen des endokrinen Pankreas fand ähnlich wie im Fall von OPG am β-Zellmodell der Ins-1E-Zellen statt. Der dafür konstruierte SOCS2-Überexpressionsvektor pcDNA3-SOCS2 (s. Abschnitt 2.2.1.14 und 3.2.2) wurde zunächst für transiente Transfektionen, später auch zur Herstellung stabiler Ins-1E-SOCS2-Klone verwendet (s. Abschnitt 2.3.3.1). Die Selektion der insgesamt 20 ausgewählten Einzelklone fand mit Hilfe einer semi-quantitativen RT-PCR und einer anschließenden Sequenzierung der daraus resultierenden PCR-Produkte statt. Das PCR-

Resultat der in späteren Versuchen verwendeten Klone 1 und 16 sowie eines "negativen" Klons (Nr. 7) ist in folgender Abbildung 3.30 repräsentativ dargestellt.



<u>Abb. 3.30</u>: Expressionsnachweis von exogenem SOCS2 in verschiedenen potentiell stabil transfizierten Ins-1E-Klonen mittels semi-quantitativer RT-PCR. Als Template für die PCR-Reaktion wurde die mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschriebene RNA der potentiell stabil mit pcDNA3-SOCS2 transfizierten Ins-1E-Klone verwendet, von denen repräsentativ die Klone 1, 7 und 16 dargestellt sind. Die Normalisierung der Proben erfolgte mit Hilfe des "house-keeping"-Gens *gapdh*. Als interne Kontrolle (= K) diente cDNA untransfizierter Ins-1E-Zellen. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und nach Interkalation von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Die funktionsfähige Überexpression von exogenem SOCS2 in den stabilen Ins-1E-SOCS2-Klonen (1 und 16) im direkten Vergleich zum endogen exprimierten SOCS2 der Ins-1E-Zellen konnte im Western-Blot nachgewiesen werden. Dafür benutzte Proteinextrakte wurden jeweils nach einer Inkubationsdauer von 72 h gewonnen und daran befindliche SOCS2-Proteine (ca. 22,4 kDa) mit Hilfe von anti-SOCS2-Anti-körpern immunologisch detektiert (Abb. 3.31).



<u>Abb. 3.31</u>: Expressionsnachweis von endogenem bzw. überexprimiertem SOCS2 in Ins-1E-Zellen und stabilen Ins-1E-SOCS2-Klonen durch eine Western-Blot-Analyse. Ins-1E-Zellen und stabile Ins-1E-SOCS2-Zellen (Klon 1 und 16) wurden jeweils für 72 h in serumhaltigem Medium inkubiert. Nach anschließender Proteinextraktion erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine im SDS-Gel, der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran sowie eine immunologische Detektion mit anti-SOCS2-Antikörpern bzw. anti-β-Aktin-Antikörpern.

Entgegengesetzt zu den funktionellen Analysen mit überexprimierten SOCS2-Proteinen sollte zusätzlich die Auswirkung einer unterdrückten SOCS2-Genexpression Aufschluss über dessen physiologische Funktion in der  $\beta$ -Zelle ermöglichen. Die Effizienz des RNAi-vermittelten SOCS2-"Gensilencing" wurde auf translationaler Ebene sowohl in unbehandelten Ins-1E-Zellen als auch in stabilen Ins-1E-SOCS2-Zellen durch Western-Blot-Analysen überprüft. Dafür erfolgte deren Transfektion mit jeweils zwei verschiedenen SOCS2-siRNA-Oligonukleotiden bzw. einer als Kontrolle fungierenden "nonsense"-siRNA. Die nach einer Inkubationsdauer von 72 h gewonnenen Gesamtproteinlysate wurden anschließend elektrophoretisch in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran folgte schließlich die Detektion von SOCS2 mit anti-SOCS2-Antikörpern. Obwohl jeweils dieselben Proteinmengen der unterschiedlichen Proben verwendet wurden, diente eine zusätzliche Detektion mit anti- $\beta$ -Aktin-Antikörpern als interne Kontrolle (Abb. 3.32).



<u>Abb. 3.32</u>: Analyse der RNA-Interferenz-vermittelten SOCS2-Suppression in Ins-1E- und stabilen Ins-1E-SOCS2-Zellen auf translationaler Ebene. Die Zellen (hier: Ins1E-SOCS2-Klon 16) wurden nach Transfektion mit jeweils 50 nM siRNA für 72 h in serumhaltigem Medium inkubiert. Von den anschließend gewonnenen Gesamtproteinlysaten erfolgte die elektrophoretische Auftrennung durch eine SDS-PAGE, der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran sowie die immunologische Detektion der Proteine mit anti-SOCS2-Antikörpern bzw. anti-β-Aktin-Antikörpern. "Nonsense" siRNA (= siK), verschiedene SOCS2-siRNAs (= si4, si7).

Wie aus Abbildung 3.32 ersichtlich, konnte durch Anwendung beider SOCS2-siRNAs unter den gewählten Transfektions- und Inkubationsbedingungen eine deutliche Suppression von endogenem als auch exogenem SOCS2 auf Proteinebene erzielt werden. Ein zusätzlicher Nachweis der Suppressionsfähigkeit auf transkriptioneller Ebene war dadurch nicht mehr erforderlich.

#### 3.2.5.3 Analyse des Effektes von SOCS2 auf die Proliferation von β-Zellen

# 3.2.5.3.1 *In vitro*-Untersuchung der physiologischen Funktion von SOCS2 im Rahmen der GH-stimulierten β-Zellproliferation

In Abschnitt 3.2.3 konnte an den Insulinomzelllinien Ins-1E und MIN6 gezeigt werden, dass eine 4-tägige Überexpression von SOCS2 unter unstimulierten Bedingungen keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation pankreatischer  $\beta$ -Zellen ausübt (Abb. 3.12). Da SOCS2 primär eine regulatorische Funktion in der Signaltransduktion des Wachstumshormons Somatotropin ("growth hormone"; GH) besitzt und dieses die Proliferation von  $\beta$ -Zellen stimuliert, wurden weitere *in vitro*-Untersuchungen zur Analyse einer potentiellen SOCS2-Funktion hinsichtlich der Proliferation von  $\beta$ -Zellen unter Verwendung von rekombinantem GH durchgeführt (Favre *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 1999; Metcalf *et al.*, 2000).

In einem ersten Versuch sollte zunächst mit Hilfe von Ins-1E- und SOCS2-überexprimierenden Ins-1E-SOCS2-Zellen die Wirkung von SOCS2 auf die GH-induzierte Proliferation mit Hilfe des Proliferationsmarkers BrdU untersucht werden. Für diesen Zweck wurden die Zellen jeweils auf gelatinebeschichteten Deckgläschen ausgesät und nach Erreichen einer geeigneten Konfluenz für 24 h in serumfreiem Medium mit BrdU (3,33 nM) inkubiert. Für einen Teil der jeweiligen Zelllinien erfolgte die Inkubation in diesem Zeitraum zusätzlich mit exogenem GH (50 ng/ml). Die Zellen wurden anschließend mit BrdU-Cy3 und DAPI gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich ihrer prozentualen Proliferation analysiert (Abb. 3.33A). Um zu testen, welchen Einfluss ein Fehlen von SOCS2 auf die Proliferation von  $\beta$ -Zellen hat, wurde dasselbe Experiment mit Ins-1E-Zellen unter Anwendung der RNA-Interferenz durchgeführt. Die 24-stündige Inkubation mit BrdU erfolgte in diesem Fall jeweils 72 h nach Transfektion der Zellen mit "nonsense"- bzw. SOCS2-siRNA (Abb. 3.33B).





Die prozentuale Proliferationsrate unbehandelter Ins-1E-Zellen lag ähnlich der von Ins-1E-Zellen mit einer Suppression von SOCS2 auf einem niedrigen Basalniveau von etwa 18,40  $\pm$  2,31 %, während SOCS2-überexprimierende Ins-1E-SOCS2-Zellen im unstimulierten Zustand tendenziell weniger proliferierten (12,63  $\pm$  0,44 %). Im Vergleich zu Ins-1E-Zellen bewirkte eine Stimulation mit GH eine Abnahme proliferierender Ins-1E-SOCS2-Zellen und einen leichten Proliferationsanstieg

SOCS2-siRNA-behandelter Ins-1E-Zellen (Abb. 3.33). Jedoch war die relative GH-Proliferationsinduktion in allen untersuchten Ansätzen unabhängig von einer Überexpression oder Suppression von SOCS2 relativ gleich. Es wurde durch GH bei Ins-1E- und Ins-1E-SOCS2-Zellen die Proliferation um das 2,38  $\pm$  0,28-fache induziert, bei siRNA-behandelten Ins-1E um das 1,89  $\pm$  0,39-fache.

Das zu den Zytokinen zählende Wachstumshormon GH vermittelt seine Signale auch in den β-Zellen über die Tyrosinkinase JAK2 und den Transkriptionsfaktor STAT5 (Friedrichsen et al., 2001). In einem zweiten Experiment sollte deshalb der Einfluss von SOCS2 auf die Aktivierung von STAT5 in GH-stimulierten Ins-1E-Zellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden sowohl Ins-1E-Zellen als auch zwei unterschiedliche Ins-1E-SOCS2-Klone zunächst für unterschiedlich lange Inkubationszeiten mit rekombinantem human-GH (50 ng/ml) inkubiert und anschließend im Western-Blot unter der Anwendung von anti-Phospho-STAT5a/b- und anti-STAT5a/b-Antikörpern analysiert (Abb. 3.34). Durch die dabei detektierten Proteinbanden (ca. 92 kDa) konnte eine GH-induzierte Aktivierung beider Isoformen des Transkriptionsfaktors STAT5 (STAT5a und STAT5b) über den gesamten Untersuchungszeitraum von 1 h bis einschließlich 24 h nachgewiesen werden. Die Intensität der anhand phosphorylierter STAT5-Proteine erkennbaren Aktivierung erschien nach 4 h und 8 h GH-Stimulation etwa schwächer und nahm im späteren Verlauf wieder zu. Im direkten Vergleich ergaben sich jedoch letztendlich keine deutlichen Unterschiede in der STAT5-Aktivierung zwischen Ins-1E-Zellen und den SOCS2überexprimierenden Ins-1E-SOCS2-Klonen (Abb. 3.34).

Ahnlich wie im zeitabhängigen GH-Stimulationsversuch wurde zusätzlich die Aktivierung von STAT5a/b in Abhängigkeit der GH-Konzentration in Ins-1E- und Ins-1E-SOCS2-Zellen mit Hilfe einer Western-Blot-Analyse bestimmt. Die Stimulation der Zellen erfolgte hierfür in serumfreiem Medium ohne bzw. mit unterschiedlichen Konzentrationen GH (0,05 bis 500 ng/ml) für den Zeitraum von 1 h (Abb. 3.35). Dabei konnte eine SOCS2-vermittelte Verschiebung der zur Induktion einer STAT5-Phosphorylierung notwendigen GH-Konzentration um eine Zehnerpotenz festgestellt werden. Während in untransfizierten Ins-1E-Zellen bereits 0,5 ng GH pro ml Medium eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT5 zur Folge hatte, benötigten Ins-1E-SOCS2-Klone zur Erzielung eines vergleichbaren Effektes eine GH-Dosis von 5 ng/ml. Als interne Kontrolle für eine quantitativ gleiche Proteinbeladung diente wie


schon im vorherigen Versuch eine zusätzliche Detektion des ubiquitär relativ stark exprimierten Proteins β-Aktin (Abb. 3.35).

<u>Abb. 3.34</u>: Luminogramm einer Western-Blot-Analyse von Ins-1E- und Ins-1E-SOCS2-Zellen nach einer zeitabhängigen Stimulation mit GH und einer immunologischen Detektion mit anti-Phospho-STAT5a/b-, anti-STAT5a/b- und anti-β-Aktin-Antikörpern. Ins-1E- und stabile Ins-1E-SOCS2-Zellen (Klon 1 und 16) wurden nach 72 h Inkubation in serumhaltigem Medium einmal mit PBS gewaschen und anschließend über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert. Am nächsten Tag folgte die Stimulation der Zellen mit rekombinantem human-GH (50 ng/ml) für 1 h, 2h, 4 h, 8 h, 10 h, 12 h bzw. 24 h. Nach Proteinextraktion der lysierten Zellen und elektrophoretischer Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE-Gel, erfolgten deren Blot und immunologische Detektion mit anti-Phospho-STAT5a/b-Antikörpern. Nach erstmaligem Strippen der Membranen und Detektion mit Antikörpern





<u>Abb. 3.35</u>: Luminogramm einer Western-Blot-Analyse von Ins-1E- und Ins-1E-SOCS2-Zellen nach einer dosisabhängigen Stimulation mit GH und einer immunologischen Detektion mit anti-Phospho-STAT5a/b-, anti-STAT5a/b- und anti- $\beta$ -Aktin-Antikörpern. Ins-1E- und stabile Ins-1E-SOCS2-Zellen (Klon 1 und 16) wurden nach 72 h Inkubation in serumhaltigem Medium einmal mit PBS gewaschen und anschließend über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert. Am nächsten Tag folgte eine einstündige Stimulation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen rekombinantem human-GH (0 / 0,05 / 0,5 / 5 / 50 / 500 ng/ml). Nach Proteinextraktion der lysierten Zellen und elektrophoretischer Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE-Gel, erfolgten deren Blot und immunologische Detektion mit anti-Phospho-STAT5a/b-Antikörpern. Nach erstmaligem Strippen der Membranen und Detektion mit Antikörpern gegen die unphosphorylierte Form von STAT5a/b wurden die Membranen erneut gestrippt und mit anti- $\beta$ -Aktin-Antikörpern detektiert. Um *in vitro* weiter zu testen, ob SOCS2 einen Einfluss auf den Transkriptionsfaktor STAT5 ausübt, wurde das Experiment mit isolierten Pankreasinseln wiederholt. Als Spender dienten genetisch unveränderte C57BL/6-Mäuse sowie SOCS2-defiziente SOCS2-Knockout-Mäuse, in denen man aufgrund des in Abbildung 3.35 dargestellten Ergebnisses eine schwächere GH-Dosis für eine ausreichende STAT5-Aktivierung erwartet hätte. Da alle zuvor untersuchten Ins-1E-Zelllinien nach einer einstündigen Stimulation mit GH in einer Konzentration von 5 ng/ml eine STAT5-Phosphorylierung aufwiesen, erfolgte der Versuch unter diesen Stimulationsbedingungen. Dabei konnte jedoch in keiner der Inselproben phosphoryliertes STAT5 detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

#### 3.2.5.3.2 Analyse der Kompensierung potentieller SOCS2-Effekte

Trotz der bekannten Funktion von SOCS2 als Regulator des "GH-Signalings" konnte basierend auf den bisher erhaltenen Ergebnissen keine direkte Assoziation von SOCS2 mit der GH-stimulierten Proliferation von β-Zellen nachgewiesen werden. Aufgrund der strukturellen Homologien und der Fähigkeit zur gegenseitigen Regulation von SOCS-Proteinen besteht grundsätzlich die Möglichkeit einer Kompensierung des SOCS2-Effektes durch andere Proteine derselben Familie (Krebs & Hilton, 2001). Aus diesem Grund wurde im Folgenden mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR untersucht, wie sich eine Überexpression bzw. Suppression von SOCS2 auf die SOCS1- und SOCS3-Genexpression in pankreatischen β-Zellen auswirkt. Als Template der jeweiligen PCR-Reaktionen diente entweder cDNA von Ins-1E- und Ins-1E-SOCS2-Zellen oder cDNA isolierter C57BL/6- bzw. SOCS2<sup>-/-</sup>Pankreasinseln (Abb. 3.36).

Wie in Abbildung 3.36 erkennbar, bewirkte eine SOCS2-Überexpression keine detektierbare Veränderung der SOCS1-Expression, während ein SOCS2-Defizit entgegengesetzt der Erwartungen in einer Reduktion der transkripierten SOCS1-Menge in murinen Pankreasinseln resultierte. Hinsichtlich der Expression von SOCS3 konnte in Ins-1E-Zellen durch eine Überexpression von SOCS2 eine sichtbare Reduktion aufgezeigt werden. Ein Knockout von SOCS2 hatte jedoch diesbezüglich keine erkennbaren Folgen (Abb. 3.36).



<u>Abb. 3.36</u>: Expressionsnachweis von endogenem SOCS1 und SOCS3 in Ins-1E- und Ins-1E-SOCS2-Zellen (A) sowie in isolierten C57BL/6- und SOCS2<sup>-/-</sup>-Pankreasinseln (B). Als Template für die semi-quantitative RT-PCR wurde die mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgeschriebene RNA der Ins-1E- bzw. Ins-1E-SOCS2-Zellen oder der pankreatischen Inseln von C57BL/6- bzw. SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäusen verwendet. Die Normalisierung erfolgte mit Hilfe des "housekeeping"-Gens *gapdh*. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und nach Interkalation von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Aufgrund der Tatsache, dass die Expression von SOCS3 zumindest auf transkriptionaler Ebene durch eine SOCS2-Überexpression beeinflusst wird und GH in Ins-1E-Zellen die SOCS3-Expression bekanntermaßen induziert, sollte diesbezüglich der Effekt einer SOCS2-Überexpression auf die SOCS3-Expression überprüft werden (Ronn *et al.*, 2002). Für diesen Zweck wurden Proben der GH-stimulierten Ins-1E- und stabilen Ins-1E-SOCS2-Zellen (s. Abschnitt 3.2.5.3.1) zusätzlich für einen Western-Blot unter Anwendung von anti-SOCS3-Antikörpern herangezogen. Die daraus resultierenden Proteinbanden wiesen nach, dass eine 1- bzw. 4-stündige Stimulation mit exogenem GH (50 ng/ml) auch die Genexpression von SOCS3 in untransfizierten Ins-1E-Zellen deutlich induziert. Im Gegensatz dazu konnte in beiden Ins-1E-SOCS2-Klonen keine (Klon 16) bzw. eine nur relativ schwache Zunahme der detektierbaren SOCS3-Proteinmenge nach einer einstündigen GH-Stimulation nachgewiesen werden (Abb. 3.37).



<u>Abb. 3.37</u>: Luminogramm einer Western-Blot-Analyse von Ins-1E- und Ins-1E-SOCS2-Zellen nach GH-Stimulation und einer immunologischen Detektion mit anti-SOCS3- und anti-β-Aktin-Antikörpern. Ins-1E- und Ins-1E-SOCS2-Zellen (Klon 1 und 16) wurden nach 72 h Inkubation in serumhaltigem Medium einmal mit PBS gewaschen und anschließend über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert. Am nächsten Tag folgte die Stimulation der Zellen mit rekombinantem human-GH (50 ng/ml) für 1 h bzw. 4 h. Als Kontrolle dienten jeweils unstimulierte Zellen (0 h). Nach Proteinextraktion der lysierten Zellen und elektrophoretischer Auftrennung der Proteine im SDS-PAGE-Gel erfolgten deren Blot und immunologische Detektion mit anti-SOCS3-Antikörpern. Nach dem Strippen der Membran wurden die Proteine zur Ladungskontrolle mit anti-β-Aktin-Antikörpern detektiert.

#### 3.2.5.3.3 Bestimmung der β-Zellmasse in SOCS2-Knockout-Mäusen

Die  $\beta$ -Zellmasse im adulten Pankreas stellt ein dynamisches Gleichgewicht aus Proliferation und Apoptose der  $\beta$ -Zellen dar (Dor *et al.*, 2004). Deshalb wurde zur Klärung einer potentiellen Regulatorfunktion von SOCS2 in der Proliferation von  $\beta$ -Zellen die  $\beta$ -Zellmasse als zusätzlicher Parameter herangezogen. Als Versuchstiere dienten C57BL/6- und SOCS2-Knockout-Mäuse, welche zum Zeitpunkt der Pankreasisolation ein Alter zwischen 11 und 17 Wochen besaßen. Aufgrund der ähnlichen  $\beta$ -Zellmassen innerhalb der beiden Mausstämme war letztendlich keine Differenzierung nach Geschlecht erforderlich. SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickeln bereits im Alter von 3 Wochen einen ausgeprägten Gigantismus, aufgrund dessen sie bis zu 40 % schwerer sind als Wildtypmäuse (Metcalf *et al.*, 2000). Da dieser auch in der Größe des Pankreas zum Ausdruck kommt, wurde die quantifizierte  $\beta$ -Zellmasse in Relation zum Körpergewicht gesetzt (Abb. 3.38).

Wie in Abbildung 3.38 dargestellt, konnte kein Unterschied im Verhältnis von β-Zellmasse zu Körpergewicht im Vergleich von SOCS2-exprimierenden C57BL/6- und SOCS2-defizienten SOCS2-Knockout-Mäusen nachgewiesen werden. Dies steht in Übereinstimmung mit der jeweils ermittelten *in vivo*-Proliferation, welche unter Anwendung einer einwöchigen BrdU-Inkorporation und einer daran anschließenden Immunfluoreszenzdoppelfärbung der proliferierenden und insulinproduzierenden Zellen sichtbar gemacht wurde. Dabei konnte im optischen Vergleich kein deutlicher Unterschied zwischen C57BL/6- und SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



<u>Abb. 3.38</u>: Bestimmung des Verhältnis von  $\beta$ -Zellmasse zu Körpergewicht von C57BL/6- und SOCS2-Knockout-Mäusen. Die jeweiligen  $\beta$ -Zellmassen und das dazugehörige Körpergewicht von jeweils sechs Tieren pro Gruppe (Männchen und Weibchen gemischt) wurden im Alter von 11 bis 17 Wochen bestimmt.

#### 3.2.5.4 Analyse des Effektes von SOCS2 auf die β-Zellapoptose

#### 3.2.5.4.1 *In vitro*-Analyse des Einflusses von SOCS2 auf die Apoptose von β-Zellen

Da die Apoptose von  $\beta$ -Zellen in der Pathogenese beider Hauptformen des Diabetes mellitus eine entscheidende Rolle spielt, sollte des Weiteren eine potentielle biologische Funktion des Proteins SOCS2 im Rahmen der  $\beta$ -Zellapoptose aufgeklärt werden (Eizirik & Mandrup-Poulsen, 2001; Cnop *et al.*, 2005). Für diesen Zweck erfolgten *in vitro* sowohl am  $\beta$ -Zellmodell der Ins-1E-Zellen als auch an isolierten Mausinseln Versuche, in welchen entweder die proapoptotischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  oder die gesättigte Fettsäure Palmitat zur Induktion einer Apoptose dienten.

In einem ersten Assay wurde zunächst in unbehandelten Ins-1E-Zellen die zeitabhängige Expression von endogenem SOCS2 nach einer kombinierten Stimulation mit IL-1 $\beta$  (1 ng/ml), IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) und TNF- $\alpha$  (1000 U/ml) unter Anwendung einer semi-quantitativen RT-PCR analysiert (Abb. 3.39). Erwartungsgemäß konnte dabei eine rasche zytokininduzierte Hochregulation der SOCS2-Transkription gezeigt werden, welche nach 4 h bzw. 8 h wieder rückläufig war (Starr *et al.*, 1997; Santangelo *et al.*, 2005).



<u>Abb. 3.39</u>: Expressionsnachweis von endogenem SOCS2 in Ins-1E-Zellen nach Zytokinstimulation. Als Template für die semi-quantitative RT-PCR wurde die mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschriebene RNA der Ins-1E-Zellen verwendet. Die Zellen wurden vor RNA-Isolation für unterschiedlich lange Inkubationszeiten (1 h, 2 h, 4 h bzw. 8 h) mit einem Zytokinmix (= ZM) aus IL-1 $\beta$  (1 ng/ml), IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) und TNF- $\alpha$  (1000 U/ml) in serumfreiem Medium inkubiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Ins-1E-Zellen (= K). Die Normalisierung erfolgte mit Hilfe des "house-keeping"-Gens *gapdh*. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und nach Interkalation von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Innerhalb der letzten Jahre wurde durch verschiedene Studien belegt, dass Proteine der SOCS-Familie als Feedback-Inhibitoren des JAK/STAT-Weges fungieren und auf diese Weise die intrazelluläre Signalübertragung einer Vielzahl von Zytokinen regulieren (Krebs & Hilton, 2001; Greenhalgh & Hilton, 2001). Dabei konnte auch eine Induktion der SOCS-Proteine SOCS1 und SOCS3 durch JAK/STAT-unabhängige, proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$  und ein dadurch vermittelter Schutz der  $\beta$ -Zelle vor deren zytotoxischen Wirkungen nachgewiesen werden (Karlsen *et al.*, 2001; Chong *et al.*, 2004). In Anbetracht dessen und der zytokininduzierten SOCS2-Genexpression in Pankreasinseln stellte sich die Frage, ob auch SOCS2 einen protektiven Effekt auf pankreatische  $\beta$ -Zellen ausüben kann.

Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurden Pankreasinseln von C57BL/6bzw. von SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert und für 48 h in serumfreiem Medium ohne bzw. mit einer Kombination der rekombinanten Zytokine IL-1 $\beta$  (1 ng/ml), IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) und TNF- $\alpha$  (1000 U/ml) inkubiert. Zur anschließenden Vitalitätsbestimmung der Inseln erfolgten deren Färbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst33342 und Propidiumiodid sowie ein optischer Vergleich der unterschiedlichen Ansätze unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die daraus resultierenden Beobachtungen zeigten zwar eine zytokininduzierte Apoptose der Inselzellen, welche jedoch in allen zytokinbehandelten Ansätzen eine relativ gleiche Intensität aufwies. Der erwartete Effekt der aufgrund des Fehlens eines protektiven SOCS2-Proteins verstärkt apoptotischen Wirkung des Zytokinmixes auf SOCS2<sup>-/-</sup>-Inseln konnte auch nach einer 24- bzw. 48-stündigen Inkubation mit einem leicht weniger toxisch wirkenden Cocktail aus IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) und IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) bzw. IL-1 $\beta$  (0,1 ng/ml) und IFN- $\gamma$  (100 U/ml) nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt; entsprechen Abb. 3.24).

Ähnlich wie schon im Abschnitt 3.2.4.5 im Rahmen der OPG-Versuche beschrieben wurden weitere in vitro-Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung von SOCS2 im Bezug auf die Apoptose von β-Zellen anhand der Insulinomzelllinie Ins-1E durchgeführt. In diesem Zusammenhang kamen sowohl untransfizierte als auch transient bzw. stabil mit pcDNA3-SOCS2 transfizierte Ins-1E-Zellen zum Einsatz. Dafür wurden die Zellen zunächst für 72 h in serumhaltigem Medium kultiviert und unmittelbar danach zur Entfernung der Serumreste einmal mit PBS gewaschen. Anschließend folgte eine 24-stündige Inkubation in serumfreiem Medium, in denen die Zellen entweder ohne Zusatz oder a) mit Palmitat (0,5 mM) oder b) mit dem Zytokin IL-1ß (100 pg/ml) inkubiert wurden. Eine Stimulation mit einer Zytokinkombination aus IL-1 $\beta$  (100 pg/ml), IFN- $\gamma$  (100 U/ml) und TNF- $\alpha$  (100 U/ml) wurde aufgrund eines zu starken Apoptoseeffektes nicht verwendet (s. Abschnitt 3.2.4.5). Um den SOCS2-Einfluss auf die proapoptotische Wirkung der unterschiedlichen Substanzen auswerten zu können, wurde im Anschluss der Stimulation die β-Zellvitalität der einzelnen Ansätze mit Hilfe des MTT-Tests ermittelt. Aufgrund der unterschiedlichen Proliferationsraten transient bzw. stabil transfizierter Zellen wurden die jeweiligen Vitalitätsunterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen prozentual errechnet.

Wie aus Abbildung 3.40A ersichtlich, induzierte eine 24-stündige Inkubation mit der gesättigten Fettsäure Palmitat eine starke Apoptose der Ins-1E-Zellen (je p < 0,001). Im direkten Vergleich war jedoch weder zu transient SOCS2-überexprimierenden Ins-1E-Zellen (Daten nicht gezeigt) noch zu Ins-1E-SOCS2-Zellen ein signifikanter Unterschied in der Apoptoserate erkennbar (Abb. 3.40A).



<u>Abb. 3.40</u>: MTT-Assay von Ins-1E- und stabilen Ins-1E-SOCS2-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Palmitat (A) bzw. mit IL-1 $\beta$  (B). Ins-1E- und Ins-1E-SOCS2-Zellen (A: Klon 1 bzw. 16; B: Klon 16) wurden entweder unbehandelt ausgesät (A) oder revers mit jeweils 50 nM siRNA (- = "nonsense" siRNA; + = SOCS2-siRNA) transfiziert (B). Nach 72 h Inkubation erfolgte ein Waschschritt mit PBS, eine 24-stündige Inkubation in serumfreiem Medium ohne bzw. mit Palmitat (0,5 mM; A) oder IL-1 $\beta$  (100 pg/ml; B) und die Bestimmung der relativen Zellvitalitäten im MTT-Assay. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen. Die unstimulierten Zellen sind jeweils als 100 % definiert.

Die nach einer 24-stündigen Stimulation mit IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) induzierte Apoptose der transient mit pcDNA3 bzw. pcDNA3-SOCS2 transfizierten Ins-1E-Zellen erwies sich ähnlich der Palmitatstimulation als höchst signifikant (jeweils p < 0,001). Es konnten jedoch auch hier keine SOCS2-abhängigen Differenzen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu besaßen IL-1 $\beta$ -stimulierte Ins-1E-SOCS2-Klone mit einer prozentualen Vitalität von 79,18 ± 13,39 % eine tendenziell höhere Vitalität als IL-1 $\beta$ -behandelte Ins-1E-Kontrollzellen (67,41 ± 7,20 %). Eine Wiederholung des Versuches unter Anwendung spezifischer siRNAs zeigte jedoch, dass eine SOCS2-Suppression sowohl in Ins-1E-Zellen auch in Ins-1E-SOCS2-Zellen kaum einen Effekt auf die IL-1 $\beta$ -induzierte Apoptose ausübte (Abb. 3.40B).

#### 3.2.5.4.2 Einfluss von SOCS2 auf die Aktivierung der MAP-Kinasen JNK1/2, p44/42-MAPK und p38-MAPK nach IL-1β-Stimulation *in vitro*

Proteine der SOCS-Familie sind vorwiegend als Inhibitoren des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges bekannt. Dennoch wirken auch Stimuli wie IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ , welche ihre Signale eher JAK/STAT-unabhängig über die Aktivierung des NF-kBund MAPK-Weges weiterleiten, als Induktoren einiger SOCS-Proteine. Diesbezüglich konnte ein SOCS3-vermittelter Schutz der β-Zellen vor einer TNF-α-induzierten Apoptose gezeigt werden, welcher die Inhibierung von MAP-Kinasen involvierte (Krebs & Hilton, 2001; Karlsen et al., 2001; Bruun et al., 2009). Da eine Modulation des JAK/STAT-Weges durch SOCS2 hinsichtlich einer GH-stimulierten Proliferation der β-Zellen nicht nachgewiesen werden konnte und SOCS2 zu einer protektiven Funktion gegenüber einer IL-1

ß-vermittelten 

ß-Zelltoxizität tendierte, sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob SOCS2 in den 
ß-Zellen einen Einfluss auf die IL-1β-induzierte Aktivierung der MAP-Kinasen JNK1/2, p44/42-MAPK und p38-MAPK besitzt. Zu diesem Zweck wurden Ins-1E- und Ins-1E-SOCS2-Zellen mit "nonsense"bzw. SOCS2-siRNA transfiziert (je 50 nM) und nach einer 72-stündigen Inkubation für 20 min ohne bzw. mit IL-1β (100 pg/ml) in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der jeweils aktivierten und nicht-aktivierten Formen der zu untersuchenden MAP-Kinasen mit entsprechenden anti-Phospho-MAPK- und anti-MAPK-Antikörpern im Western-Blot (Abb. 3.41).

Wie in Abbildung 3.41 dargestellt, konnte weder eine Überexpression noch eine Suppression von SOCS2 die IL-1β-induzierte Phosphorylierung der Stresskinase JNK1/2 beeinflussen. Obwohl es sich aufgrund der selbst im unstimulierten Zustand aktivierten p44/42-MAPK generell als schwierig erwies Aussagen über eine SOCS2-vermittelte Veränderung zu treffen, schien SOCS2 auch keinen Einfluss auf deren Stimulation auszuüben. Bezüglich der Stresskinase p38-MAPK konnten in Ins-1E-SOCS2-Zellen nach IL-1β-Stimulation intensivere Proteinbanden in der phosphorylierten Form detektiert werden als in den Kontrollzellen. Damit übereinstimmend





<u>Abb. 3.41</u>: Luminogramm einer Western-Blot-Analyse von Ins-1E- und Ins-1E-SOCS2-Zellen (Klon 16) nach immunologischer Detektion der phosphorylierten und unphosphorylierten Form der MAP-Kinasen JNK1/2 (A), p44/42-MAPK (B) und p38-MAPK (C) sowie jeweils einer Detektion mit anti- $\beta$ -Aktin-Antikörpern. Die verschiedenen Ins-1E-Zelllinien wurden jeweils mit 50 nM siRNA transfiziert (- = "nonsense" siRNA; + = SOCS2-siRNA), nach 72 h Inkubation in serum-haltigem Medium einmal mit PBS gewaschen und anschließend über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine 20-minütige Stimulation mit bzw. ohne IL-1 $\beta$  (100 pg/ml). Nach Proteinextraktion der lysierten Zellen und elektrophoretischer Auftrennung der Proteine im SDS-

PAGE-Gel erfolgten deren Blot und immunologische Detektion mit anti-Phospho-JNK1/2-, anti-Phospho-p44/42-MAPK bzw. anti-Phospho-p38-MAPK-Antikörpern. Nach erstmaligem Strippen der Membranen und Detektion mit Antikörpern gegen die jeweils unphosphorylierte Form der MAPK-Proteine wurden die Membranen erneut gestrippt und mit anti-β-Aktin-Antikörpern detektiert.

## 3.2.5.4.3 *In vivo*-Untersuchung des Einflusses von SOCS2 auf die autoimmunvermittelte Zerstörung pankreatischer β-Zellen

Der Typ-1-Diabetes mellitus ist durch eine autoimmunbedingte, selektive Zerstörung der pankreatischen β-Zellen charakterisiert. Eine entscheidende Rolle in dieser hauptsächlich apoptosevermittelten β-Zellzerstörung spielen infiltrierende Immunzellen und deren sezernierte, proinflammatorische Zytokine (Eizirik & Mandrup-Poulsen, 2001; Pirot et al., 2008). Da von SOCS2 eine Regulatorfunktion des "Zytokinsignalings" beschrieben wurde, sollte in vivo zusätzlich an einem Modell des Typ-1-Diabetes mellitus getestet werden, ob SOCS2 einen regulatorischen Effekt auf die Apoptose der β-Zellen ausübt (Santangelo et al., 2005; Rico-Bautista et al., 2006). Zu diesem Zweck kam die sogenannte "Multiple low-dose Streptozotocin"-(MLDS)-Applikation zum Einsatz, in welcher durch mehrmalige Gabe niedriger Dosen des β-Zelltoxins Streptozotocin (STZ) eine immunvermittelte Diabetesentwicklung in Gang gesetzt wird (O'Brien et al., 1996). Für diesen Versuch wurde 9 Wochen alten SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäusen beiden Geschlechts an fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils 40 mg STZ pro Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Als Vergleichstiere dienten genetisch unveränderte, parallel behandelte C57BL/6-Mäuse derselben Altersklasse. Um in den folgenden Tagen Aussagen über eine Diabetesentwicklung zu ermöglichen, wurde von allen Tieren täglich (beginnend am Tag 7 nach erstmaliger STZ-Applikation bis einschließlich Tag 18; Ausnahme: Tag 12 und 13) der Blutzuckerspiegel bestimmt (Abb. 3.42). Bei Überschreitung einer Konzentration von 250 mg/dl erfolgte am nächsten Tag zur Sicherstellung einer diabetesbegründeten Hyperglykämie eine Wiederholung der Blutzuckermessung nach einer Nahrungskarenz von 6 h.



<u>Abb. 3.42</u>: Zeitabhängiger Blutzuckerverlauf von C57BL/6- und SOCS2-Knockout-Mäusen nach MLDS-Behandlung. Den Versuchstieren wurde im Alter von 9 Wochen an fünf aufeinander folgenden Tagen intraperitoneal jeweils 40 mg STZ pro Körpergewicht injiziert. Innerhalb der folgenden zwei Wochen folgte regelmäßig die Bestimmung des Blutzuckerspiegels. Diese Messung wurde ohne vorheriges Fasten der Tiere durchgeführt. Sobald jedoch die Blutzuckerkonzentration einen Wert von 250 mg/dl überschritt, wurde die Messung am nächsten Tag nach einer Nahrungskarenz von 6 h wiederholt. Aufgrund der geschlechterspezifischen Unterschiede erfolgte eine Differenzierung zwischen Männchen (A) und Weibchen (B). Angegeben sind pro Zeitpunkt die Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen der jeweils enthaltenen Blutzuckerkonzentrationen von mindestens 2 Tieren pro Gruppe.

Wie in Abbildung 3.42B dargestellt, wiesen weibliche Tiere eine Resistenz gegenüber der STZ-Wirkung auf und besaßen auch nach Versuchsende ausschließlich normoglykämische Blutzuckerwerte. Dieses Ergebnis war erwartungsgemäß für den C57BL/6-Wildtypstamm und vergleichbar mit dem des SOCS2-Knockout-Stammes (Paik *et al.*, 1982; Le *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu entwickelten die Männchen beider Mausgruppen in der zweiten Versuchswoche einen manifesten Diabetes mellitus, welcher durch kontinuierlich hyperglykämische Werte mit einem durchschnittlichen Maximum von  $383,00 \pm 79,02$  mg/dl bei C57BL/6-Männchen und  $348,00 \pm 99,45$  mg/dl bei SOCS2<sup>-/-</sup>-Männchen gekennzeichnet war. Signifikante Unterschiede zwischen den Blutzuckerspiegeln von C57BL/6- und SOCS2-Knockout-Mäusen konnten jedoch auch bei den STZ-sensitiven Männchen nach MLDS-Behandlung nicht nachgewiesen werden, so dass das Fehlen eines funktionsfähigen SOCS2-Gens letztendlich keinen Einfluss auf die STZ-induzierte, autoimmunvermittelte Entwicklung eines Typ-1-Diabetes mellitus ausübte (Abb. 3.42A).

#### 3.2.5.5 Untersuchung des Einflusses von SOCS2 auf die β-Zellfunktion

# 3.2.5.5.1 In vitro-Analyse der physiologischen Funktion von SOCS2 auf die glukosestimulierte Insulinsekretion von Ins-1E-Zellen sowie von C57BL/6- und SOCS2-Knockout-Mauspankreasinseln

Um aufzuklären, ob SOCS2 unter physiologischen Bedingungen bedeutsam für die Regulation der Insulinsekretion von pankreatischen β-Zellen ist, wurden glukosestimulierte Insulinsekretionsversuche an Ins-1E-Zellen und isolierten Langerhans'schen Inseln durchgeführt. Letztere wurden von SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäusen sowie von wildtypischen C57BL/6-Kontrollmäusen isoliert (Abb. 3.43). Die Insulinsekretionsassays in Ins-1E-Zellen fanden 72 h nach transienter Transfektion mit den Vektoren pcDNA3 bzw. pcDNA3-SOCS2 statt, die von Pankreasinseln nach einer im Anschluss deren Isolation über Nacht stattfindenden Regenerationsphase. Für die Untersuchung der glukoseabhängigen Insulinsekretion wurden Ins-1E-Zellen für 30 min und Pankreasinseln für 60 min in glukosefreiem Medium mit verschiedenen Glukosekonzentrationen stimuliert. Diese lagen innerhalb des physiologisch limitierten Konzentrationsbereiches von 2,8 mM bis einschließlich 16,7 mM. Die letztendliche Detektion der in den jeweiligen Ansätzen ins Kulturmedium sekretierten Insulinmengen erfolgte mit Hilfe eines Insulin-ELISA.

Wie aus Abbildung 3.43 ersichtlich, ließ sich die Insulinsekretion sowohl von Ins-1E-Zellen als auch isolierter C57BL/6- und SOCS2<sup>-/-</sup>-Pankreasinseln in Abhängigkeit der verwendeten Glukosekonzentrationen stimulieren. Diesbezüglich konnte jedoch weder bedingt durch eine SOCS2-Überexpression noch durch eine SOCS2-Defizienz ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen nachgewiesen werden.



<u>Abb. 3.43</u>: Glukosestimulierte Insulinsekretion transient mit pcDNA3 bzw. pcDNA3-SOCS2 transfizierter Ins-1E-Zellen (A) und isolierter C57BL/6- bzw. SOCS2-Knockout-Pankreasinseln (B). Ins-1E-Zellen wurden transient mit den Vektoren pcDNA3 bzw. pcDNA3-OPG transfiziert und für 72 h inkubiert (A), Langerhans sche Inseln wurden nach Isolation aus C57BL/6- bzw. SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäusen über Nacht regeneriert (B). Anschließend erfolgte die Stimulation der Ins-1E-Zellen bzw. Pankreasinseln für 30 min bzw. für 60 min mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (2,8 mM, 5,6 mM, 11,2 mM bzw. 16,7 mM) und die Bestimmung der sekretierten Insulinmenge unter Verwendung eines Insulin-ELISA. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte und dazugehörigen Standard-abweichungen repräsentativer, glukoseabhängiger Insulinsekretionen im untersuchten Zeitraum.

#### 3.2.5.5.2 In vivo-Untersuchung der Glukosetoleranz von SOCS2-Knockout-Mäusen

Zur weiteren Klärung der Frage, ob SOCS2 bedeutsam für die physiologische Funktion von β-Zellen ist, sollten die Auswirkungen eines fehlenden SOCS2-Proteins bezüglich der Glukosetoleranz und Insulinsekretion *in vivo* untersucht werden. Für diesen Zweck wurden intraperitoneale Glukosetoleranztests (ip-GTT) mit SOCS2-Knockout-Mäusen und C57BL/6-Kontrollmäusen im Alter zwischen 8 und 12 Wochen durchgeführt (Abb. 3.44).



<u>Abb. 3.44</u>: Intraperitonealer Glukosetoleranztest mit C57BL/6- und SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäusen. Nach einer Nahrungskarenz von 6 h, einer Blutzuckermessung und Blutabnahme der Mäuse (= Zeitpunkt 0) erfolgte jeweils eine intraperitoneale (ip) Injektion von 2 g Glukose (Glc) pro kg Körpergewicht (KG). Ab diesem Zeitpunkt wurde jeweils nach 15 min, 30 min, 60 min und 120 min nochmals die Blutzuckerkonzentration bestimmt und eine ausreichende Menge Blut aus der Schwanzvene entnommen. Die Insulinkonzentration der gesammelten Blutproben wurde im Anschluss mit Hilfe eines Insulin-ELISA ermittelt. Graphisch angegeben sind die Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen der Blutzucker- (A, C) und Plasmainsulinkonzentrationen (B, D) sowie der AUCs der Blutzuckerkurven (E, F), welche jeweils für Weibchen (A, B, E; n = 7) und Männchen (C, D, F; n = 8) separat dargestellt

sind. Die unter Anwendung des t-Tests ermittelten statistischen Signifikanzen (p < 0,01) sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet und beziehen sich jeweils auf die zeitlich entsprechenden Werte zwischen C57BL/6- und SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäusen.

Wie in Abbildung 3.44A graphisch dargestellt, zeigten weibliche SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäuse innerhalb der ersten 15 min nach ip-Injektion von Glukose eine signifikant stärkere, glukoseinduzierte Blutzuckererhöhung als gleichgeschlechtliche Kontrollmäuse. Betrachtet man die dazugehörigen Plasmainsulinwerte, so fällt auf, dass beide Mausstämme in den ersten 15 min eine ähnliche Insulinmenge sekretierten. SOCS2-Knockout-Mäuse benötigten jedoch anschließend eine tendenziell gesteigerte Insulinsekretion, um nach insgesamt 60 min den Blutzuckerspiegel auf das Niveau der C57BL/6-Kontrollen zu reduzieren. (Abb. 3.44B). Bedingt durch die relativ großen Zeitintervalle eines ip-GTTs ist es jedoch nicht möglich, detaillierte Aussagen über das Insulinsekretionsprofil der beiden Tiergruppen zu treffen. Trotz des anfänglich deutlich höheren Anstiegs der Blutzuckerkonzentration von SOCS2-defizienten Weibchen ergaben sich letztendlich im Vergleich der AUCs ("area under the curve") keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.44E). Dieses Ergebnis zeigt, dass ein systemisches Fehlen von SOCS2 keine Glukoseintoleranz der weiblichen Mäuse verursacht.

Hinsichtlich der männlichen SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäuse konnte im ip-GTT eingangs ebenfalls eine tendenzielle Erhöhung des Blutzuckerspiegels nachgewiesen werden. Dieser kam vor allem in den deutlich erhöhten Blutzuckerwerten 30 min und 60 min nach Glukoseinjektion zum Ausdruck (C57BL/6 vs. SOCS2<sup>-/-</sup>: 246,88 ± 41,29 mg/dl vs. 301,88 ± 55,31 mg/dl nach 30 min bzw. 181,63 ± 28,84 mg/dl vs. 222,75 ± 65,43 mg/dl nach 60 min; Abb. 3.44C) und war zumindest teilweise in der verschlechterten Insulinsekretion der SOCS2-Knockout-Mäuse begründet. So lag die sekretierte Insulinmenge SOCS2-defizienter Tiere nach Glukoseinjektion durchschnittlich 30 % unter dem Sekretionsniveau genetisch unveränderter C57BL/6-Mäuse und die erste Phase der Insulinsekretion fehlte scheinbar - ähnlich wie bei Typ-2-Diabetikern beinahe vollständig (Abb. 3.44D). Letztendlich zeigten jedoch auch die im untersuchten Zeitraum festgestellten Unterschiede bezüglich der Blutzuckerkonzentrationen männlicher Versuchstiere im Vergleich der AUCs keine statistische Signifikanz und somit keine Glukoseintoleranz (Abb. 3.44F).

Um zu überprüfen, ob SOCS2 möglicherweise erst nach einer längeren Zeitspanne Effekte auf den Glukosemetabolismus ausübt, fand zusätzlich ein ip-GTT mit älteren SOCS2<sup>-/-</sup>- und C57BL/6-Mäusen in einem Alter von 26 Wochen statt. Die daraus resultierten Ergebnisse entsprachen jedoch denen jüngerer Mäuse (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigten SOCS2-Knockout-Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren keine signifikante Beeinflussung der Glukosetoleranz, jedoch unmittelbar nach dem Glukosebolus einen verstärkten Anstieg der Blutzuckerkonzentration (Abb. 3.44). Um festzustellen, ob diese Beobachtung auf einer beeinträchtigten ersten Phase der Insulinsekretion begründet ist, wurden zur besseren Beurteilung der frühen Insulinantwort auf eine definierte Glukosebelastung zusätzlich intravenöse Glukosetoleranztests durchgeführt. Wie in Abbildung 3.45 ersichtlich, wiesen die dabei erhaltenen Plasmainsulin- und Blutzuckerkurven Parallelen zu denen im ip-GTT auf. Sie zeigten keine Unterschiede zwischen C57BL/6- und SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäusen und verdeutlichten anhand der deutlich biphasischen Insulinsekretionskurve, dass SOCS2-defiziente Mäuse beiden Geschlechts keine konsistente Störung der Insulinsekretion aufweisen (Abb. 3.45).



<u>Abb. 3.45</u>: Intravenöser Glukosetoleranztest mit C57BL/6- und SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäusen. Nach einer Nahrungskarenz von 6 h, einer Blutzuckermessung und Blutabnahme der Mäuse (= Zeitpunkt 0) erfolgte jeweils eine intravenöse (iv) Injektion von 1 g Glukose (Glc) pro kg Körpergewicht (KG). Ab diesem Zeitpunkt wurde jeweils nach 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min und 60 min nochmals die

Blutzuckerkonzentration bestimmt und eine ausreichende Menge Blut aus der Schwanzvene entnommen. Die Insulinkonzentration der gesammelten Blutproben wurde im Anschluss mit Hilfe eines Insulin-ELISA ermittelt. Graphisch angegeben sind die Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen der Blutzucker- (A, C) und Plasmainsulinkonzentrationen (B, D), welche jeweils für Weibchen (A, B; n = 2) und Männchen (C, D; n = 2) separat dargestellt sind.

#### 3.2.5.5.3 *In vivo*-Untersuchung der Insulintoleranz von SOCS2-Knockout-Mäusen

Um zu klären, ob SOCS2 einen Einfluss auf die Insulinempfindlichkeit ausübt, kamen Insulintoleranztests (ITTs) zum Einsatz. Als Versuchstiere dienten hierfür 8 bis 12 Wochen alte SOCS2-Knockout- und C57BL/6-Mäuse. Diesen wurde nach einer 6stündigen Fastenperiode 750 IU Insulin pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die innerhalb der nächsten 60 min gemessenen Blutzuckerkonzentrationen sollten anschließend im Vergleich zum jeweiligen Ausgangswert Aufschluss über die Wirkung des injizierten Insulins geben. Da beide Mausstämme vor dem Insulinbolus unterschiedlich hohe Blutzuckerausgangswerte besaßen, wurden die gemessenen Blutzuckerspiegel zur besseren Darstellung des insulinbedingten Effektes prozentual angegeben (Abb. 3.46).



<u>Abb. 3.46</u>: Intraperitonealer Insulintoleranztest mit C57BL/6- und SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäusen. Nach einer Nahrungskarenz von 6 h und einer Blutzuckermessung der Mäuse (= Zeitpunkt 0) erfolgte jeweils eine intraperitoneale (ip) Injektion von 750 IU Insulin (Ins) pro kg Körpergewicht (KG). Ab diesem Zeitpunkt wurde jeweils nach 15 min, 30 min, 60 min, 90 min und 120 min nochmals die Blutzuckerkonzentration bestimmt. Graphisch angegeben sind die Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen der prozentualen Blutzuckerwerte der jeweiligen Weibchen (A; n = 6) bzw. Männchen (B; n = 7).

Innerhalb der ersten 30 min nach Injektion bewirkte Insulin in SOCS2-Knockout-Mäusen einen deutlichen, vergleichbaren Abfall des Blutzuckerspiegels wie in C57BL/6-Kontrollmäusen (C57BL/6-vs. SOCS2<sup>-/-</sup>-: 53,78 ± 8,19 % vs. 53,32 ± 5,25 %; C57BL/6-3 vs. SOCS2<sup>-/-</sup>-3: 63,08 ± 9,90 % vs. 56,77 ± 6,77 %). In beiden Versuchsgruppen blieb der Blutzuckerspiegel in den daran anschließenden 30 min auf einer konstanten Ebene (Abb. 3.46). Insgesamt ergibt sich aus den ITTs kein Anhalt für eine Beeinflussung der Insulinempfindlichkeit durch SOCS2.

## 4. Diskussion

Zu einer der global am stärksten expandierenden Erkrankungen zählt mit einer momentanen Prävalenz von mindestens 230 Millionen Patienten der Diabetes mellitus. Ein relatives Defizit des blutzuckersenkenden Peptidhormons Insulin charakterisiert dabei den in etwa 90 % aller Fälle auftretenden Typ-2-Diabetes (Gerich, 2003). Obwohl bereits ein breites Spektrum an Therapiemöglichkeiten besteht, stellen die Sekundärkomplikationen und erhöhten Mortalitätsraten von Typ-2-Diabetikern weiterhin ein schwerwiegendes Problem dar. Der Entwicklung neuer Strategien zur Prävention und Kontrolle des Diabetes mellitus gilt daher weiterhin großes Interesse (Zimmet *et al.*, 2001; Reimann *et al.*, 2009). Das Ziel der vorliegenden Dissertation war es deshalb, neue zelluläre und molekulare Aspekte der β-Zelldysfunktion beim Typ-2-Diabetes mellitus aufzuklären.

## 4.1 Zelluläre Aspekte der β-Zelldysfunktion in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus

Es ist bekannt, dass das relative Insulindefizit beim Typ-2-Diabetes vorwiegend auf eine Kombination aus einer peripheren Insulinresistenz und einer Dysfunktion der pankreatischen  $\beta$ -Zellen zurückführen ist. Ob die ebenfalls für einen Typ-2-Diabetes charakteristische Reduktion der  $\beta$ -Zellmasse als Folge oder Ursache der diabetischen Stoffwechselsituation auftritt, ist allerdings unklar. Da bisher keine Möglichkeiten zur nicht-invasiven Messung der  $\beta$ -Zellmasse zur Verfügung stehen, kann diese Frage beim Menschen noch nicht geklärt werden (Kahn & Flier, 2000; Gerich, 2003; Surampudi *et al.*, 2009). Um genauere Erkenntnisse über die sequenzielle Abfolge von Ereignissen während der Entwicklung eines Typ-2-Diabetes mellitus zu gewinnen, wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit zelluläre Analysen des endokrinen Pankreas an zwei verschiedenen Inzuchtstämmen des Typ-2-Diabetesmodells der db/db-Maus vorgenommen, die aufgrund ihres unterschiedlichen genetischen Hintergrundes Differenzen in der Diabetessuszeptibilität besitzen.

## 4.1.1 Genetische Determination der Diabetessuszeptibilität beim Tiermodell der db/db-Maus

Die verwendeten Versuchstiere wiesen die Mitte der 60er Jahre von Hummel *et al.* bei Mäusen des Stammes C57BLKS/J beschriebene, spontan aufgetretene und autosomal rezessiv vererbte Mutation auf. Das betroffene Gen, welches den Leptinrezeptor kodiert, erhielt aufgrund des beobachteten Phänotyps die Bezeichnung db für Diabetes (Hummel *et al.*, 1966; Tartaglia *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996). Unter physiologischen Umständen initiiert das von Adipozyten sekretierte Hormon Leptin durch Bindung an den vorwiegend im Hypothalamus lokalisierten Leptinrezeptor ein Sättigungsgefühl und reguliert dadurch die Balance zwischen Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch (Halaas *et al.*, 1995; Campfield *et al.*, 1995; Ahima *et al.*, 1996). Die bei db/db-Mäusen aufgrund funktionsunfähiger Leptinrezeptoren gestörte Leptinsignaltransduktion führt deshalb zu einer ausgeprägten Polyphagie der Tiere. Homozygote Mäuse entwickeln infolgedessen eine ausgeprägte Adipositas (Abb. 3.1).

Über verschiedene Mechanismen führt diese Adipositas zur Entstehung einer Insulinresistenz (Kahn & Flier, 2000; Tilg & Moschen, 2008). Da Leptin eine inhibitorische Wirkung auf die Insulingenexpression und die Insulinsekretion besitzt, begünstigt eine Leptinresistenz zusätzlich die Entstehung einer chronischen Hyperinsulinämie, welche wiederum das Fortschreiten einer Insulinresistenz unterstützt (Fehmann et al., 1997; Seufert et al., 1999). Der insgesamt daraus resultierende Anstieg des Insulinbedarfs wird bei db/db-Mäusen in Abhängigkeit des genetischen Hintergrundes unterschiedlich gut kompensiert. Ähnlich wie vom Tiermodell der leptindefizienten ob/ob-Maus bekannt, weisen deshalb Mäuse mit C57BL/6J-Hintergrund (db/db B6) unter denselben Umweltbedingungen lediglich eine Glukoseintoleranz auf, während ein C57BLKS/J-Hintergrund (db/db BKS) die Entwicklung eines manifesten Typ-2-Diabetes mellitus zur Folge hat (Hummel et al., 1972; Coleman & Hummel, 1973). Welche Gene konkret für diese ungleiche Diabetessuszeptibilität verschiedener db/db-Mausstämme verantwortlich sind, konnte abgesehen vom Wissen um einen polygenen Vererbungsmodus bisher nicht aufgeklärt werden (Kaku et al., 1989). Des Weiteren gibt es derzeit in der Literatur keine direkten Vergleiche von db/db B6- und db/db BKS-Mäusen, die sich auf das entscheidende Alter von 5 bis 12 Wochen beziehen, in dem sich beide Phänotypen auseinander entwickeln.

Bisherige Veröffentlichungen bezogen sich entweder auf Pankreasinseln deutlich älterer db/db-Mäuse oder sie verglichen lediglich einen der homozygoten db/db-Mausstämme mit entsprechenden Kontrolltieren (Boquist *et al.*, 1974; Gapp *et al.*, 1983; Matsuda *et al.*, 2008; Kanda *et al.*, 2009). Dies bedeutet, dass auch keine Daten über die primären Mechanismen existieren, welche ausschlaggebend für die Entwicklung der unterschiedlichen Phänotypen sind. Da grundsätzlich Unterschiede in der peripheren Insulinresistenz, der Funktion einzelner  $\beta$ -Zellen oder der Größe der  $\beta$ -Zellmasse als Ursachen in Frage kommen, fokussierten sich unsere Untersuchungen auf diese Parameter.

4.1.2 Diabetessuszeptibilität von db/db BKS-Mäusen begründet auf einer inadäquaten Anpassung der β-Zellmasse

## 4.1.2.1 Phänotypische Unterschiede zwischen db/db B6- und db/db BKS-Mäusen trotz vergleichbarer Insulinresistenz

Die zwischen db/db-Mäusen mit C57BL/6J- und C57BLKS/J-Hintergrund ab einem Alter von 9 Wochen bekannten, signifikanten Differenzen im Nüchternblutzucker konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Abb. 3.2). Um zunächst festzustellen, ob eine unterschiedliche Insulinresistenz der beiden untersuchten Mausstämme ursächlich an der Entstehung dieser unterschiedlichen Phänotypen beteiligt ist, wurde parallel zum Blutzucker auch das jeweilige Plasmainsulin gemessen und aus beiden Werten der HOMA-IR-Index als Näherungswert der Insulinresistenz ermittelt (Abb. 3.3; Abb. 3.4). Dieser Index findet nicht nur eine sehr häufige Anwendung in klinischen Studien, sondern wurde auch bereits für Mausmodelle evaluiert (Lee et al., 2008). Durch diesen in Relation zu heterozygoten Kontrolltieren berechneten HOMA-Index konnte in dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden, dass beide db/db-Mausstämme im Alter von 5 bis 12 Wochen eine ähnlich ausgeprägte Insulinresistenz besitzen und deren glykämische Differenzen deshalb nicht durch einen unterschiedlich großen Insulinbedarf begründet sind. Interessanterweise zeigten eher die diabetessuszeptiblen db/db BKS-Mäuse eine tendenziell schwächer ausgeprägte Insulinresistenz als die diabetesresistenten db/db-Mäuse mit C57BL/6J-Hintergrund (Abb. 3.4). Dieser Unterschied wird besonders im Alter von 8 Wochen deutlich. Obwohl beide db/db-Mausstämme zu diesem Zeitpunkt relativ ähnliche

Blutzuckerwerte aufwiesen, benötigten db/db B6-Mäuse dafür eine signifikant höhere Insulinausschüttung (Abb. 3.2; Abb. 3.3). Daraus lässt sich folgern, dass die unterschiedliche Kompensierungseffizienz der verwendeten db/db-Mausstämme vorwiegend auf das Maß der sekretierbaren Insulinmengen, und nicht auf die periphere Insulinresistenzsituation zurückzuführen ist.

## 4.1.2.2 Diabetessuszeptibilität von db/db BKS-Mäusen basiert auf einem altersbedingten Kompensierungsdefizit der β-Zellmasse

Eine vermehrte Insulinsekretion kann prinzipiell durch Veränderungen in der β-Zellfunktion und/oder in der β-Zellmasse erreicht werden. In dieser Hinsicht ist seit vielen Jahren bekannt, dass db/db B6-Mäuse ihren erhöhten Insulinbedarf zumindest teilweise durch β-Zellhyperplasien kompensieren. Allerdings weisen auch junge db/db-Mäuse mit C57BKS/J-Hintergrund im Vergleich zu Kontrolltieren erhöhte Insulinspiegel und eine Hyperproliferation der  $\beta$ -Zellen auf (Like & Chick, 1970; Boquist *et* al., 1974). In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals detailliert gezeigt werden, wie sich der unterschiedliche Phänotyp der verwendeten Tiere altersabhängig und schrittweise entwickelt. Diesbezüglich wurde zunächst beobachtet, dass beide db/db-Mausstämme unabhängig vom genetischen Hintergrund bis zu einem Alter von 7 Wochen in der Lage sind, den Blutzuckerspiegel durch eine ausgeprägte Kompensierung auf einem physiologischen Niveau zu halten (Abb. 3.2). Diese Anpassung geschieht bei beiden homozygoten Tiergruppen durch eine ähnlich ausgeprägte Hyperinsulinämie, welche durch eine leicht verbesserte  $\beta$ -Zellfunktion und eine 5,5fache Expansion der β-Zellmasse gewährleistet wird (Abb. 3.3; Abb. 3.5). Wie ebenfalls im Kontrast zu heterozygoten db/+-Kontrollmäusen erkennbar, korrelierte diese β-Zellhyperplasie beider db/db-Mausstämme mit einer in diesem Alter signifikant verstärkten  $\beta$ -Zellproliferation (Abb. 3.8). Um trotz des grundsätzlich relativ geringen  $\beta$ -Zellumsatzes die Erhebung möglichst realitätsnaher Vergleichsdaten zu gewährleisten, wurden die Proliferationsraten nicht wie üblich nach einer eher kurzen Applikation des Replikationsmarkers BrdU ermittelt, sondern nach einer einwöchigen BrdU-Aufnahme über das Trinkwasser (Kushner et al., 2005; Rankin & Kushner, 2009). Da dabei ausschließlich die Proliferation der  $\beta$ -Zellen untersucht wurde, kann in diesem Zusammenhang über den wahrscheinlich eher geringen Einfluss der βZellneogenese keine Aussage getroffen werden (Bonner-Weir, 2000a; Matsuda et al., 2008).

Die sich schließlich ab einem Alter von 8 Wochen differenzierenden Phänotypen beider db/db-Mausstämme sind auf einer deutlich ausdauernderen Kompensierungskapazität von Tieren mit C57BL6/J-Hintergrund begründet. Sichtbar wurde diese nicht nur in der stärker ausgeprägten Hyperinsulinämie, sondern auch durch Betrachtung der β-Zellmasse. Während die β-Zellmasse von db/db BKS-Mäusen ab einem Alter von 7 Wochen stagnierte, verzeichnete diejenige von db/db B6-Mäusen einen weiteren, kontinuierlichen Anstieg, der zwischen 7 und 10 Wochen eine nochmalige β-Zellexpansion um 47 % erreichte (Abb. 3.5A). In Anbetracht der engen Korrelation zwischen den Plasmainsulinwerten und der 
ß-Zellmasse in diesem Zeitraum wird deutlich, dass die Hyperplasie der β-Zellen direkt für die progrediente Hyperinsulinämie bei db/db B6-Mäusen verantwortlich ist (Abb. 3.3). Eine zusätzliche Verbesserung der β-Zellsekretionskapazität war für deren effektive Kompensierung nicht notwendig. Untermauert wird dieses Resultat durch das Verhältnis von Plasmainsulinmenge zu β-Zellmasse, das unter der Voraussetzung einer konstanten Insulin-"Clearance" eine unveränderte β-Zellfunktion der db/db B6-Mäuse im Alter von 7 bis 10 Wochen bestätigt (Abb. 3.5C).

Basierend auf diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass die Diabetesanfälligkeit von db/db BKS-Mäusen letztlich altersabhängig auftritt und primär durch eine inadäquate Expansion der  $\beta$ -Zellmasse begründet ist. Damit übereinstimmend konnten ähnliche Ergebnisse auch bei den ebenfalls leptinrezeptordefizienten fa/fa-Ratten gefunden werden (Pick *et al.*, 1998; Topp *et al.*, 2007). Welche zellulären Mechanismen dabei eine Rolle spielen, wurde in der vorliegenden Arbeit im direkten Vergleich zu db/db B6-Mäusen deutlich. Obwohl diese auch einer altersabhängigen Reduktion der  $\beta$ -Zellproliferationsrate ausgesetzt sind, können sie im Gegensatz zu den db/db BKS-Mäusen eine  $\beta$ -Zellhyperproliferation auch noch im Alter von 10 und 12 Wochen aufrechterhalten und dadurch eine weitere, ausreichende Expansion der  $\beta$ -Zellmasse erzielen (Abb. 3.8A; Abb. 3.5). In Übereinstimmung mit unserer Beobachtung, dass db/db BKS-Mäuse im Alter zwischen 8 und 12 Wochen ihre  $\beta$ -Zellproliferationsrate ausgesetzt sind, können sie im selben Zeitraum eine signifikante Reduktion der Genexpression mitogener Proteine in pankreatischen db/db BKS-Inseln nachgewiesen (Kanda *et al.*, 2009). Ein möglicher molekularer Mecha-

nismus dieses Phänomens könnte, wie von Uchida *et al.* postuliert, die nukleäre Akkumulation des Zellzyklusinhibitors p27 sein (Uchida *et al.*, 2005). Im Gegensatz zur inadäquaten  $\beta$ -Zellmasse scheint die im Alter von 10 Wochen tendenziell verschlechterte  $\beta$ -Zellfunktion der db/db BKS-Mäuse - ähnlich wie bei fa/fa-Ratten - nicht Ursache, sondern erst Folge dieser chronisch erhöhten Blutzuckerspiegel zu sein (Abb. 3.5C) (Kjorholt *et al.*, 2005; Topp *et al.*, 2007). Dementsprechend ist eine für den Typ-2-Diabetes beim Menschen charakteristische Störung der ersten Insulinsekretionsphase bei db/db-Mäusen mit C57BKS/J-Hintergrund auch erst ab einem Alter von 16 Wochen nachweisbar (Brenner *et al.*, 2003).

Um festzustellen, welchen Einfluss der programmierte Zelltod auf die β-Zellmasse von db/db-Mäusen ausübt, wurden TUNEL-Assays sowohl an db/db B6- und db/db BKS-Mäusen als auch an db/+-Kontrolltieren im Alter zwischen 7 und 12 Wochen durchgeführt. Diesbezüglich ist zunächst zu berücksichtigen, dass die Apoptose ein sehr schnell ablaufender Prozess ist, der in vivo innerhalb weniger Stunden abläuft (Coles et al., 1993). Neben diesem schmalen Zeitfenster erschweren generelle, technische Schwierigkeiten der TUNEL-Färbung meist zusätzlich die Quantifizierung apoptotischer Zellen, weshalb in der vorliegenden Arbeit auf eine gleichzeitige Insulinfärbung verzichtet wurde. Da murine  $\beta$ -Zellen einen Inselzellanteil von bis zu 80 % einnehmen und zentral lokalisiert sind, wurden anstelle dessen TUNELpositive, periphere Inselzellen von der Zählung ausgeschlossen (Steiner et al., 2010). Ähnlich wie aus anderen Studien mit fa/fa-Ratten und db/db BKS-Mäusen bekannt, konnte auf diese Weise eine geringe Anzahl TUNEL-positiver, endokriner Zellen detektiert werden (Pick et al., 1998; Kaneto et al., 1999; Jetton et al., 2005; Uchida et al., 2005). Dabei zeigte sich aber das dennoch robuste Ergebnis, dass diabetessuszeptible db/db BKS-Mäuse eine 4,5-fach höhere Inselzellapoptoserate aufweisen als gleichaltrige db/db B6-Mäuse (Abb. 3.9A). Homozygote BKS-Mäuse besaßen zwar bereits im prädiabetischen Alter von 7 und 8 Wochen einer höhere Anzahl apoptotischer Zellen. Eine signifikante Zunahme der Apoptose war erst nach Manifestation des Typ-2-Diabetes mellitus nachzuweisen. Aufgrund der relativ wenigen Versuchstiere lässt sich jedoch letztendlich nicht eindeutig klären, ob die erhöhte β-Zellapoptose der db/db BKS-Mäuse bereits zu einem frühen Zeitpunkt aufgrund einer unabhängigen, genetischen Determination auftritt oder erst sekundär durch glukotoxische Effekte der chronischen Hyperglykämie hervorgerufen wird. Sicher ist nur,

dass Letztere selektiv eine Apoptose der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen induzieren kann und auf diese Weise den Diabetes der db/db BKS-Mäuse noch verschlechtern könnte (Butler *et al.*, 2003; Chang-Chen *et al.*, 2008). Diesbezüglich konnte die Arbeitsgruppe von Kaneto *et al.* durch eine frühzeitige Behandlung von db/db BKS-Mäusen mit Antioxidantien indirekt zeigen, dass die unter hyperglykämischen Bedingungen durch oxidativen Stress induzierte Apoptose zur Reduktion deren  $\beta$ -Zellmasse führt (Kaneto *et al.*, 1999). Zusätzlich wurden in  $\beta$ -Zellen 12 Wochen alter db/db BKS-Mäuse verstärkte Anzeichen von ER-Stress, oxidativem Stress und Apoptose detektiert (Kanda *et al.*, 2009). Allerdings existieren grundsätzlich zu keiner dieser Studien Vergleiche zu gleichaltrigen db/db-Mäusen mit C57BL/6J-Hintergrund, die zumindest adipositasbedingt einem ähnlichen Stress ausgesetzt sein dürften wie db/db BKS-Mäuse (Ozcan *et al.*, 2004).

Insgesamt lässt sich aus den erhaltenen Daten ableiten, dass die Diabetessuszeptibilität von db/db BKS-Mäusen auf einem genetisch determinierten Defizit basiert, eine adäquate β-Zellexpansion über ein Alter von 7 Wochen hinaus aufrechtzuerhalten. Eine langfristige Kompensierung des insulinresistenzbedingt erhöhten Insulinbedarfs kann deshalb nicht gewährleistet werden. Ob diese Beobachtung auch beim Menschen für die Pathogenese des Typ-2-Diabetes relevant ist, bleibt derzeit unklar. Aus humanen Autopsien ist zwar bekannt, dass bei Insulinresistenz zunächst wahrscheinlich ebenfalls eine Anpassung über eine Expansion der β-Zellmasse stattfindet, und dass auch die β-Zellmasse von Typ-2-Diabetikern mit fortschreitender Erkrankung abnimmt (Rahier et al., 2008; Matsuda et al., 2008; Kahn et al., 2009). Über die Abfolge der zur Diabetesentstehung führenden Ereignisse sowie die daran beteiligten Mechanismen liegen jedoch noch keine Kenntnisse vor. Eine β-Zelldysfunktion im Sinne einer gestörten ersten Phase der Insulinsekretion scheint beim Menschen aber früher aufzutreten als im db/db-Mausmodell. Dies wurde an Verwandten ersten Grades von Typ-2-Diabetikern sowie an anderen Personen mit generell erhöhtem Diabetesrisiko demonstriert, die trotz einer normalen bzw. nur leicht gestörten Glukosetoleranz bereits Beeinträchtigungen der ersten Insulinsekretionsphase aufwiesen (Kahn, 2003; Kahn et al., 2009). Ahnlich wie bereits durch eine effektive GLP-1-Behandlung an prädiabetischen db/db BKS-Mäusen gezeigt, könnte sich aber ausgehend von unseren Daten auch beim Menschen eine frühzeitige medikamentöse Unterstützung der β-Zellmasse als vielversprechende

Option erweisen, eine Diabetesentwicklung bei prädisponierten Personen zu verhindern (Wang & Brubaker, 2002). Um dieser Möglichkeit nachzugehen, könnten die seit einigen Jahren erfolgreich in der Therapie des Typ-2-Diabetes mellitus eingesetzten GLP-1-Analoga (z.B. Exenatide) bzw. Inkretinverstärker (Gliptine) in einer klinischen Studie an Personen getestet werden, welche ein erhöhtes Risiko für eine spätere Typ-2-Diabetesentwicklung aufweisen.

## 4.1.3 Einfluss der pankreatischen α-Zellen auf die Diabetessuszeptibilität von db/db-Mäusen

Ob pankreatische α-Zellen ebenfalls eine Rolle bezüglich der unterschiedlichen Diabetessuszeptibilität von db/db B6- und db/db BKS-Mäusen spielen, wurde erstmals in dieser Arbeit durch immunhistochemische Bestimmung der  $\alpha$ -Zellmassen im Alter von 7 bis 12 Wochen untersucht. Dabei zeigte sich zunächst, dass db/db-Mäuse unabhängig vom genetischen Hintergrund eine größere α-Zellmasse als heterozygote db/+-Mäuse aufwiesen. Dieser Unterschied könnte zum Teil auf eine erhöhte Konzentration des Zytokins IL-6 zurückzuführen sein, da dieses die Expansion der α-Zellmasse positiv reguliert und unter adipösen Bedingungen systemisch erhöht ist (Spranger et al., 2003; Ellingsgaard et al., 2008). Im direkten Vergleich der homozygoten Mausstämme ergaben sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede (Abb. 3.7). Durch die extreme Zunahme der α-Zellmasse (136 %) zwischen 10 und 12 Wochen und die im selben Zeitraum um 36 % reduzierte β-Zellmasse resultiert bei den diabetessuszeptiblen db/db BKS-Mäusen eine starke, proportionale Verschiebung zugunsten glukagonproduzierender  $\alpha$ -Zellen (Abb. 3.7; Abb. 3.5A). Diese Beobachtung entspricht den in der Literatur angegebenen Daten, welche ähnliche Änderungen der Inselzellzusammensetzung bei Typ-2-Diabetikern dokumentieren (Yoon et al., 2003; Deng et al., 2004; Kahn et al., 2009). Aufgrund der blutzuckersteigernden Wirkung des katabolen Hormons Glukagon fördert die verhältnismäßig hohe α-Zellmasse nach Ausbruch des Typ-2-Diabetes mellitus vermutlich eine zusätzliche Verschlechterung der metabolischen Situation (Del & Marchetti, 2004). Da sich allerdings beide db/db-Mausstämme im entscheidenden Alter von 7 bis 10 Wochen weder in der  $\alpha$ -Zellmasse noch im Verhältnis von  $\beta$ - zu  $\alpha$ -Zellmasse (in deren jeweiligen Relation zum Körpergewicht) signifikant unterschieden, spielen pankreatische  $\alpha$ -Zellen wahrscheinlich keine ursächliche Rolle am chronisch gestörten Glukosemetabolismus der db/db BKS-Mäuse (Abb. 3.7).

#### 4.1.4 Ausblick

Der direkte Vergleich diabetesresistenter db/db B6- und diabetessuszeptibler db/db BKS-Mäuse zeigte erstmals, dass die Diabetessuszeptibilität von Mäusen mit C57BLKS/J-Hintergrund altersbedingt auftritt und primär auf einer im Verlauf inadäquaten Expansion der pankreatischen β-Zellen basiert. Ob neben der stark reduzierten β-Zellproliferation der ebenfalls bei db/db-BKS-Mäusen nachgewiesene Anstieg apoptotischer β-Zellen tatsächlich zur Diabetesentstehung beiträgt oder erst Folge des chronisch erhöhten Blutzuckerspiegels ist, ließ sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht sicher ableiten. Um darüber eine Aussage zu ermöglichen, wäre zukünftig eine Apoptosebestimmung mit deutlich größeren Tiergruppen notwendig. Diese sollten jeweils einzeln für die Altersklassen 7 und 8 Wochen (prädiabetisch) sowie für die Alterskategorien 10 und 12 Wochen (diabetisch) durchgeführt werden. Des Weiteren könnte bei einer Gruppe prädiabetischer db/db BKS-Mäuse über den Verlauf mehrerer Wochen durch die tägliche Verabreichung eines Langzeitinsulins die Entstehung hyperglykämischer Zustände unterdrückt und die altersabhängige Anzahl apoptotischen β-Zellen bestimmt werden. Im direkten Vergleich sowohl mit gleichaltrigen db/db B6- als auch mit unbehandelten db/db BKS-Mäusen sollte erkennbar werden, ob die signifikant verstärkte β-Zellapoptose bei db/db BKS-Mäusen bereits unter normoglykämischen Bedingungen auftritt und somit genetisch bedingt ist.

Betrachtet man unsere Vergleichsuntersuchungen umgekehrt, so wird deutlich, dass eine kontinuierliche Anpassung der  $\beta$ -Zellmasse ein wesentlicher protektiver Faktor sein könnte, der vor dem Auftreten eines Diabetes mellitus schützt. Da diese Anpassung aus einer konstanten  $\beta$ -Zellhyperproliferation und sehr wahrscheinlich einer niedrigen Apoptose der pankreatischen  $\beta$ -Zellen resultiert, sollten sich zukünftige Studien auf die Untersuchung von Genen fokussieren, die an der Regulation von Proliferation und Apoptose beteiligt sind und möglicherweise auch die Kompensierungskapazität humaner  $\beta$ -Zellen entscheidend beeinflussen.

## 4.2. Molekulare Aspekte der β-Zelldysfunktion in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus

4.2.1 Identifizierung neuer Kandidatengene mit potentieller Regulatorfunktion in pankreatischen β-Zellen

Während einer Schwangerschaft treten sowohl beim Menschen als auch bei Nagetieren adaptive Veränderungen der pankreatischen β-Zellen als Antwort auf den erhöhten Insulinbedarf auf. Neben der Steigerung von Glukosesensitivität und Insulinbiosynthese wird die Insulinsekretion jeder einzelnen Zelle erhöht und die β-Zellmasse durch eine vielfach gesteigerte Proliferation der 
ß-Zellen vergrößert (Sorenson & Brelje, 1997). Die dabei ablaufenden, molekularen Mechanismen sowie die daran beteiligten Regulatorproteine sind zum großen Teil noch unbekannt, stellen aber vielversprechende Ansatzpunkte zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten für den Typ-2-Diabetes mellitus dar. Das sich während der Schwangerschaft von C57BL/6-Mäusen (Tag 12,5) geänderte mRNA-Expressionsprofil der Langerhans'schen Inseln diente deshalb als Ausgangspunkt des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit, in dem neue Proteine mit einer physiologischen Funktion in den insulinproduzierenden β-Zellen des endokrinen Pankreas identifiziert werden sollten. Außer von den beiden Proteinen OPG und SOCS2, welche von allen ursprünglich ausgewählten Kandidaten detaillierter untersucht wurden und auf welche in Abschnitt 4.2.2 und 4.2.3 näher eingegangen wird, war über die anderen Kandidaten ZNRF2, COMMD7, RIK, ENY2 und TCF25 kaum etwas bekannt.

Das zur Familie der ZNRF-E3-Ubiquitin-Ligasen gehörende Protein ZNRF2 ("zinc and ring finger 2") wird besonders stark in präsynaptischen Plasmamembranen während der Entwicklung exprimiert. Es spielt vermutlich eine Rolle bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der neuronalen Plastizität und Signalweiterleitung (Araki & Milbrandt, 2003). COMMD7 ("COMM domain containing 7") hingegen gehört zu einer Familie aus 10 Mitgliedern, welche wahrscheinlich an der Regulation verschiedener biologischer Prozesse beteiligt sind, indem sie beispielsweise die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB regulieren. Wo COMMD7 exprimiert wird und welche Funktionen es ausübt, ist nicht bekannt (Maine & Burstein, 2007). Von dem relativ kleinen (ca. 9 kDa), stark konservierten Peptid RIK, welches vom "RIKEN cDNA 1110008P14 gene" kodiert wird, ist ebenfalls die Funktion völlig unbekannt. ENY2 ("enhancer of yellow 2 homolog") indessen scheint eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Genexpression zu spielen, da es an der Kopplung von Transkription und mRNA-Export beteiligt ist (Zhao *et al.*, 2008; Kurshakova *et al.*, 2009). Das vorwiegend während der embryonalen Entwicklung exprimierte TCF25 ("transcription factor 25") wurde bisher in verschiedenen murinen und humanen Geweben nachgewiesen. Von ihm werden eine regulatorische Rolle in der Kontrolle des Zelltodes und eine dadurch ermöglichte Beeinflussung des Wachstums von Tumoren vermutet (Steen & Lindholm, 2008).

In dieser Arbeit konnte nun anhand isolierter Langerhans scher Inseln männlicher und weiblicher C57BL/6-Mäuse sowie an den Insulinomzelllinien Ins-1E (Ratte) und MIN6 (Maus) erstmals die Expression der Proteine ZNRF2, COMMD7, RIK, ENY2 und TCF25 in pankreatischen  $\beta$ -Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.10). Da unsere Arbeitsgruppe ebenfalls erstmalig zeigte, dass die Expression dieser Gene am Tag 12,5 der murinen Schwangerschaft in Pankreasinseln signifikant erhöht (ZNRF2, COMMD7, RIK, ENY2) bzw. reduziert (TCF25) ist, ließ sich eine potentielle Regulatorfunktion dieser Proteine in den  $\beta$ -Zellen vermuten. Um festzustellen, welche Proteine tatsächlich eine regulatorische Relevanz besitzen, wurde von unserer Arbeitsgruppe ein funktionelles Screening durchgeführt, welches den Einfluss der einzelnen Gene auf die glukosestimulierte Insulinsekretion und Apoptose der  $\beta$ -Zellen untersuchte. Als Teil dieses Screenings wurde im Rahmen dieser Arbeit unter Anwendung entsprechend konstruierter Überexpressionsvektoren an Ins-1E- bzw. MIN6-Zellen im MTT-Assay überprüft, ob die Proliferationsrate von  $\beta$ -Zelllinien durch diese Gene jeweils beeinflusst wird (Abb. 3.12).

In diesen vorläufigen Untersuchungen zeigte sich, dass RIK wahrscheinlich keine Auswirkung auf das  $\beta$ -Zellwachstum besitzt, während TCF25 vermutlich eher einen negativen Effekt hat (Abb. 3.12). Ähnliches gilt auch für COMMD7 und Eny2, die wahrscheinlich ebenfalls einen antiproliferativen Einfluss auf pankreatische  $\beta$ -Zellen ausüben (Abb. 3.12). Da das Wachstum anderer nicht- $\beta$ -zellulärer Tumorzelllinien durch die Überexpression dieser Gene nicht inhibiert wurde, handelt es sich vermutlich in beiden Fällen um einen  $\beta$ -zellspezifischen Effekt (Abb. 3.13).

## 4.2.2 Molekulare Analyse der physiologischen Bedeutung von Osteoprotegerin in den pankreatischen β-Zellen

Das Sekretionsprotein OPG ist vorwiegend aufgrund seiner regulatorischen Funktion im Knochenmetabolismus bekannt, in dem es durch kompetitive Bindung des TNF-Proteins RANKL die osteoklastenvermittelte Knochenresorption inhibiert (Simonet *et al.*, 1997; Lacey *et al.*, 1998). Da OPG nicht nur dem tumorassoziierten Knochenabbau entgegenwirkt, sondern paradoxerweise auch das Wachstum von Tumorzellen begünstigt, wird seine Rolle hinsichtlich der Tumorzellbiologie weiterhin spekuliert (Holen & Shipman, 2006; Zauli *et al.*, 2009). Über eine Funktion von OPG im Pankreas war bisher kaum etwas bekannt.

## 4.2.2.1 Potentielle Funktion von OPG als positiver Regulator der β-Zellmasse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte *in vitro* an Langerhans schen Inseln von C57BL/6-Mäusen und an den Insulinomzelllinien Ins-1E und MIN6 nachgewiesen werden, dass OPG in pankreatischen  $\beta$ -Zellen exprimiert wird (Abb. 3.10). Mit Ausnahme einer Arbeitsgruppe, welche OPG in humanen Pankreasinseln detektierten konnte, beschränkte sich der pankreatische Expressionsnachweis von OPG bisher ausschließlich auf Tumoren oder zytokinstimulierte Zellen (Cardozo *et al.*, 2001; Satoh *et al.*, 2001; Schrader *et al.*, 2007). Von weitaus größerer Bedeutung ist jedoch die erstmalige Beobachtung, dass bei C57BL/6-Mäusen in der zweiten Schwangerschaftshälfte eine signifikante Hochregulation der OPG-Expression innerhalb der Pankreasinseln stattfand (Abb. 3.14). Da diese spezifisch in den insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen erfolgt und zeitlich mit kompensatorischen Veränderungen von  $\beta$ -Zellmasse und Insulinsekretion korreliert, lässt sich spekulieren, dass OPG als positiver Regulator von  $\beta$ -Zellmasse und  $\beta$ -Zellfunktion fungiert (Abb. 3.15; Abb. 3.16; Abb. 1.4).

Die vermutliche Rolle von OPG als positiver Regulator der β-Zellfunktion wurde zunächst unter Anwendung glukoseabhängiger Insulinsekretionsassays mit rekombinantem OPG bzw. einem transient transfizierten OPG-Überexpressionsvektor untersucht. Dabei konnte weder an isolierten C57BL/6-Pankreasinseln noch an den beiden Insulinomzelllinien Ins-1E und MIN6 ein OPG-vermittelter Unterschied

nachgewiesen werden (Abb. 3.22). Diese Daten deuten darauf hin, dass OPG keine Wirkung auf die glukosestimulierte Insulinsekretionsfähigkeit der  $\beta$ -Zellen ausübt und deshalb wahrscheinlich eher eine positive Regulatorfunktion bezüglich der pankreatischen  $\beta$ -Zellmasse einnimmt.

Bekanntermaßen sind neben einer β-Zellhypertrophie vor allem eine erhöhte β-Zellproliferation sowie eine reduzierte β-Zellapoptose für eine Expansion der β-Zellmasse notwendig (Rieck & Kaestner, 2010). Um eine mögliche Regulatorfunktion von OPG auf die β-Zellmasse zu untersuchen, wurde zunächst überprüft, ob OPG einen Einfluss auf die Proliferation von β-Zellen hat. Da sich stabile Zellklone generell in ihrer Proliferationskapazität von ihrer Ursprungszelllinie unterscheiden, war es nicht möglich, in vitro-Versuche mit Ins-1E- und Ins-1E-OPG-Zellen durchzuführen, um OPG-verursachte Differenzen in der Proliferationsrate zu erkennen. Daher wurden für einen entsprechenden Versuch isolierte C57BL/6-Pankreasinseln gewählt, welche für mehrere Tage nicht nur mit BrdU (1 µg/ml), sondern teilweise auch mit rekombinantem OPG (100 ng/ml) inkubiert wurden. Die anschließende mikroskopische Untersuchung Insulin-BrdU-doppelgefärbter Inselschnitte zeigte allerdings keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt), weshalb in einem nächsten Schritt Ins-1E-Zellen transient mit einem OPG-Überexpressionsvektor transfiziert und nach einer viertägigen Inkubationszeit im MTT-Test untersucht wurden. Hierbei ergab sich eine signifikant höhere Zellzahl nach OPG-Überexpression (Abb. 3.12A). Da jedoch die aktuelle Zellzahl in der Zellkultur immer durch Proliferations- und Zelltodraten bestimmt wird, ist es nicht möglich, aus diesem Ergebnis einen direkten mitogenen Effekt von OPG abzuleiten. Demnach könnte es sich auch um eine antiapoptotische Funktion handeln. Um diese Frage zu klären, wäre in Zukunft eine BrdU-Färbung mit transient OPG-überexprimierenden Ins-1E-Zellen im Vergleich zu untransfizierten Kontrollzellen denkbar. Zusätzlich könnte beispielsweise weiter untersucht werden, ob durch OPG die Expression bzw. Aktivierung wichtiger Zellzyklusproteine (z.B. CDK-4, p27) oder intrazellulär entscheidender Signalmoleküle (z.B. Akt) in den β-Zellen beeinflusst wird (Elghazi et al., 2006; Lee & Nielsen, 2009).

## 4.2.2.2 Protektiver Effekt von OPG gegenüber einer IL-1β-induzierten β-Zellapoptose geschieht über einen RANKL/TRAIL-unabhängigen Mechanismus

Die Apoptose pankreatischer β-Zellen ist ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese beider Hauptformen des Diabetes mellitus. Während proinflammatorische Zytokine entscheidend an der immunvermittelten β-Zellzerstörung des Typ-1-Diabetes beteiligt sind, gelten Gluko- und Lipotoxizität beim Typ-2-Diabetiker als die Hauptursachen eines vermehrten β-Zelltodes (Eizirik & Mandrup-Poulsen, 2001; Butler et al., 2003; Cnop *et al.*, 2005). Um festzustellen, ob OPG als antiapoptotischer Faktor die  $\beta$ -Zellmasse positiv reguliert, wurden zunächst hohe Konzentrationen an Glukose und/oder Palmitat zur Apoptoseinduktion gewählt. Mit diesen Substanzen konnte in vitro nach einer mindestens 24-stündigen Inkubation eine signifikant verstärkte Apoptoserate der exponierten C57BL/6-Pankreasinseln bzw. Ins-1E-Zellen erzielt werden. Die zusätzliche Kombination mit rekombinantem OPG-Fc oder eine transiente bzw. stabile Überexpression von OPG hatte allerdings bei keinem der Ansätze einen signifikanten Einfluss auf die jeweilige Apoptoseintensität (Abb. 3.24; Abb. 3.25A). Ähnliches zeigte sich an isolierten C57BL/6-Pankreasinseln nach Stimulation mit der signifikant proapoptotisch wirkenden Zytokinkombination aus IL-1 $\beta$ , IFN-y und TNF- $\alpha$ . Da sich diese Kombination in Ins-1E-Zellen aufgrund der synergistischen Zytokineffekte als zu toxisch für die Beobachtung eines potentiellen OPG-Effektes erwies, wurde ausschließlich IL-1β verwendet (Andersen et al., 2000).

Stabil OPG-überexprimierende Ins-1E-Zellen zeigten nach einer 24-stündigen Stimulation mit IL-1β eine signifikant stärkere Vitalität als untransfizierte Kontrollzellen (Abb. 3.25B). Da an anderen stabil transfizierten Ins-1E-Zellen keine ähnliche Wirkung beobachtet wurde und es möglich war, die biologische Aktivität des überexprimierten OPGs mit Hilfe eines Milzzelldifferenzierungsversuches nachzuweisen, ist der fehlende Effekt transient transfizierter Ins-1E-Zellen wahrscheinlich auf die relativ schwache Transfektionseffizienz zurückzuführen (Abb. 3.26; Abb. 3.20). Warum sich die Apoptoserate durch eine Vor- und Koinkubation mit exogenem OPG-Fc trotz dessen ebenfalls bewiesener Funktionsfähigkeit nicht änderte, ist unklar (Abb. 3.20; Abb. 3.25B). Ebenso gibt es keine Erklärung für das diesbezüglich entgegengesetzte Ergebnis von Schrader *et al.*, welches während der Entstehung dieser Arbeit veröffentlicht wurde und sich auch nach mehrmaliger exakter

Replikation des Versuches mit nachweislich biologisch aktivem OPG-Fc nicht reproduzieren ließ (Schrader *et al.*, 2007).

Das Sekretionsprotein OPG fungiert bekanntermaßen durch eine inhibitorisch wirkende Bindung seiner Liganden RANKL bzw. TRAIL (Emery et al., 1998; Lacey et al., 1998; Macfarlane, 2003). Um festzustellen, über welchen Mechanismus OPG die protektive Wirkung an Ins-1E-Zellen vermittelt, vermuteten wir deshalb zunächst die Beteiligung eines dieser beiden TNF-Proteine. Aufgrund der an verschiedenen Karzinomzellen nachgewiesenen Schutzfunktion von OPG gegenüber einer TRAILvermittelten Apoptose war diesbezüglich insbesondere eine Rolle von TRAIL denkbar (Holen & Shipman, 2006). Durch hohe Konzentrationen von rekombinantem RANKL bzw. TRAIL im Medium blieb jedoch der beobachtete Effekt nach IL-1β-Stimulation unbeeinflusst (Abb. 3.25B). Da sowohl die biologische Funktionsfähigkeit dieser beiden rekombinanten Zytokine RANKL und TRAIL als auch die Expression deren Rezeptoren RANK und TRAIL-R2 in β-Zellen nachgewiesen werden konnten, weisen alle Daten darauf hin, dass OPG seinen protektiven Einfluss auf pankreatische β-Zellen über einen RANKL/TRAIL-unabhängigen Mechanismus ausübt (Abb. 3.10; Abb. 3.14; Abb. 3.20; Abb. 3.21). Gestützt wird diese Hypothese eines alternativen Mechanismus durch die fehlende β-Zellexpression von RANKL und die unveränderte TRAIL-Expression in Pankreasinseln trächtiger C57BL/6-Mäuse (Abb. 3.10; Abb. 3.14). Aufgrund der Feststellung, dass stabil überexprimiertes OPG, jedoch nicht rekombinantes OPG-Fc die Vitalität der IL-1β-behandelten Ins-1E-Zellen verbesserte, wurde als Nächstes ein unbekannter, intrazellulärer Wirkungsmechanismus von OPG in Erwägung gezogen. Dieser erscheint zwar aufgrund dessen Eigenschaft als Sekretionsprotein eher unwahrscheinlich, widerspricht jedoch nicht der Beobachtung, dass der Schutzeffekt von OPG durch einen exogenen Überschuss seiner Liganden RANKL bzw. TRAIL unbeeinflusst blieb (Abb. 3.25B). Geht man von einer eher wahrscheinlichen, extrazellulären Wirkungsweise der sekretierten OPG-Proteine aus, so könnte deren Heparinbindedomäne dabei eine entscheidende Rolle spielen. Diese Annahme begründet sich auf der Entdeckung, dass OPG über diese Domäne an Proteoglykane mit Heparinsulfatseitenketten (z.B. Syndekan-1) binden kann (Yamaguchi et al., 1998). Diesbezüglich wurde von Standal et al. gezeigt, dass entartete Plasmazellen von Patienten mit einem multiplen Myelom in der Lage sind, durch das stark exprimierte Syndekan-1 eine Interaktion

mit OPG herzustellen, über die anschließend dessen Internalisierung und Abbau vermittelt wird (Standal et al., 2002). Des Weiteren wurde eine chemotaktische Wirkung von OPG auf Monozyten beschrieben, welche von der Syndekan-1-Expression der Immunzellen abhängig ist (Mosheimer *et al.*, 2005). Die Vermutung, dass OPG seine protektiven 
ß-Zelleffekte ebenfalls über die Heparinbindedomäne vermittelt, setzt voraus, dass die TNF-Proteine RANKL und TRAIL keinen inhibierenden Einfluss auf die Wirkung gleichzeitig mit OPG interagierender Proteoglykane ausüben. Dies ist theoretisch aufgrund der unterschiedlichen Bindedomänen der beteiligten Proteine möglich (Abb. 1.6), wird derzeit jedoch kontrovers diskutiert (Standal et al., 2002; Theoleyre et al., 2006). Da rekombinantes OPG carboxyterminal mit einem Fc-Teil fusioniert ist, der möglicherweise die Funktionsfähigkeit der ebenfalls am C-Terminus lokalisierten Heparinbindedomäne blockiert, könnte ein über die Beteiligung der Heparinbindedomäne ablaufender Mechanismus erklären, warum rekombinantes OPG trotz seiner RANKL-neutralisierenden Wirkung keinen protektiven Effekt vor IL-1ß zeigte. Generell könnte als eine alternative OPG-Funktionsweise auch die Existenz unbekannter, in der Zytoplasmamembran der β-Zellen lokalisierter Oberflächenproteine spekuliert werden, durch deren Interaktion sekretierte OPG-Moleküle ihre antiapoptotischen Signale intrazellulär weiterleiten.

#### 4.2.2.3 Protektiver Effekt von OPG gegenüber einer IL-1β-induzierten β-Zellapoptose involviert Änderungen im MAP-Kinase-Signaling

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  vermittelt seine Effekte vorwiegend über den MAPK- und den NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionsweg (Eizirik & Mandrup-Poulsen, 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte in Übereinstimmung mit anderen Studien gezeigt werden, dass IL-1 $\beta$  nicht nur die Apoptose pankreatischer  $\beta$ -Zellen induziert, sondern auch deren OPG-Expression hochreguliert (Abb. 3.25B; Abb. 3.23A) (Cardozo *et al.*, 2001; Schrader *et al.*, 2007). Um aufzuklären, über welche molekularen Mechanismen OPG die Zellen vor einer IL-1 $\beta$ -induzierten Apoptose schützt, wurde an Ins-1E-Zellen nach 20-minütiger IL-1 $\beta$ -Stimulation dessen Einfluss auf die MAPK-Aktivierung untersucht. Dabei zeigte sich, dass die IL-1 $\beta$ -induzierte Phosphorylierung der Proteine JNK1/2, p38-MAPK und p44/42-MAPK (= ERK1/2) durch eine Überexpression von OPG blockiert bzw. abgeschwächt wurde (Abb. 3.27). Im Gegensatz dazu schilderten Schrader *et al.* am selben  $\beta$ -Zellmodell lediglich eine
OPG-vermittelte Inhibierung der p38-MAPK (Schrader et al., 2007). Diese Arbeitsgruppe verwendete jedoch ausschließlich exogenes OPG-Fc, welches in dieser Arbeit trotz bewiesener Funktionsfähigkeit keinen Einfluss auf den Aktivierungszustand der untersuchten MAP-Kinasen ausübte, so dass es letztendlich keine plausible Erklärung für diesen Ergebnisunterschied gibt (Abb. 3.25B; Abb. 3.27). Da eine Aktivierung von JNK1/2 und p38 für den proapoptotischen Effekt von IL-1β notwendig ist, lassen die Daten darauf schließen, dass OPG seine protektive Funktion durch Inhibierung des MAPK-Weges ausübt (Ammendrup et al., 2000; Bonny et al., 2001; Saldeen et al., 2001; Makeeva et al., 2006). JNK wird interessanterweise auch unter diabetischen Bedingungen durch intrazellulären Stress aktiviert und bewirkt neben einer Suppression der Insulingenexpression eine Verschlechterung der Insulinsensitivität (Ozcan et al., 2004; Kaneto et al., 2005). Die Beobachtung einer OPG-vermittelten JNK-Inhibierung unterstützt deshalb zusätzlich die postulierte OPG-Funktion als positiven Regulator pankreatischer β-Zellen. Welche Bedeutung die Inhibierung von ERK1/2 auf die β-Zelle hat, erschien zunächst unklar. Einerseits wird dessen Aktivierung meist durch mitogene Stimuli wie Glukose hervorgerufen, so dass ERK1/2 grundsätzlich einen proliferativen Einfluss auf die pankreatischen β-Zellen ausübt (Burns et al., 2000; Amaral et al., 2004; Khoo et al., 2004; Imai et al., 2008). Andererseits existieren auch Beweise, dass ERK1/2 durch zelluläre Stressoren aktiviert wird und maßgeblich an der IL-1β-induzierten β-Zellapoptose beteiligt ist (Pavlovic et al., 2000; Larsen et al., 2005). Aufgrund dessen untermauert die nach IL-1β-Stimulation in Ins-1E-OPG-Zellen detektierte ERK1/2-Inhibierung wahrscheinlich unsere Hypothese, dass OPG seine protektive Wirkung durch Regulation des MAPK-Signaltransduktionsweges bewerkstelligt. Aufgrund der Vermutung, dass MAP-Kinasen die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-kB verstärken, kann über eine indirekte OPG-Beeinflussung dieses Signaltransduktionsweges spekuliert werden (Larsen et al., 2005). Eine direkte inhibitorische Wirkung von OPG auf den NF-κB-Weg zur Abschwächung der IL-1β-vermittelten Effekte ist ebenso vorstellbar und sollte in zukünftigen Studien überprüft werden.

Zusammenfassend kann in Anbetracht der bisher publizierten Daten und der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse die in Abbildung 4 schematisch dargestellte Hypothese formuliert werden.



<u>Abb. 4</u>: Hypothetisches Modell des Wirkungsmechanismus von OPG zum Schutz pankreatischer  $\beta$ -Zellen vor einer IL-1 $\beta$ -induzierten Apoptose. IL-1 $\beta$  induziert in den  $\beta$ -Zellen nach Bindung seines Rezeptor IL-1R (1) die Expression von OPG (2). Dieses vermittelt über einen RANKL/TRAILunabhängigen Mechanismus entweder intrazellulär oder extrazellulär eine Inaktivierung der MAPK-Proteine (5) und inhibiert dadurch die IL-1 $\beta$ -induzierte Apoptose (6). Erfolgt die Inhibierung extrazellulär, so bindet OPG unmittelbar nach seiner Sekretion (3) vermutlich über die Heparinbindedomäne an ein Transmembranprotein (ein Proteoglykan oder unbekanntes Protein) in der Zytoplasmamembran der  $\beta$ -Zellen (4) und initiiert dadurch seine antiapoptotische Wirkung (5-6).

Darin inhibiert das durch IL-1 $\beta$  in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen hochregulierte OPG entweder über einen intrazellulären oder extrazellulären Mechanismus (RANKL/ TRAIL-unabhängig) die Aktivierung der MAP-Kinasen JNK1/2, p38 und ERK1/2 und wirkt dadurch einer IL-1 $\beta$ -induzierten  $\beta$ -Zellapoptose entgegen. Da p38 und ERK1/2 wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der IL-1 $\beta$ -vermittelten OPG-Produktion spielen, reguliert sich OPG vermutlich auf diese Weise auch selbst (Pantouli *et al.*, 2005; Lambert *et al.*, 2007). Da das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  seine proapoptotischen Wirkungen wie IL-1 $\beta$  über den MAPK-Signalweg vermittelt und in den  $\beta$ -Zellen eine Induktion der OPG-Expression hervorruft, ist ein ähnlicher Regulationsmechanismus über OPG auch für TNF- $\alpha$  vorstellbar (Abb. 3.23A) (Eizirik & Mandrup-Poulsen, 2001; Schrader *et al.*, 2007). Insgesamt deuten die hier erhaltenen Ergebnisse darauf hin, dass OPG als Komponente eines negativen Rückkopplungsmechanismus vor einer zytokininduzierten Apoptose schützt und somit als autokriner Überlebensfaktor der pankreatischen β-Zellen fungiert.

## 4.2.2.4 Klinische Bedeutung von OPG in der Prävention und Behandlung des Diabetes mellitus

Es existieren Hinweise, dass IL-1 $\beta$  nicht nur beim autoimmunmediierten Typ-1-Diabetes, sondern auch beim Typ-2-Diabetes eine Rolle spielt (Maedler *et al.*, 2001; Maedler *et al.*, 2002; Donath *et al.*, 2005). Unter diesem Aspekt gewinnt der protektive Effekt von OPG gegenüber einer IL-1 $\beta$ -induzierten Apoptose von  $\beta$ -Zellen zusätzlich an Bedeutung. Da proinflammatorische Zytokine auch an der Entstehung einer dem Typ-2-Diabetes zugrunde liegenden Insulinresistenz involviert sind, könnte zusätzlich eine Regulatorfunktion von OPG bezüglich der Insulinsensitivität der  $\beta$ -Zellen in Erwägung gezogen werden. Diese steht auch in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die OPG-Expression während der Schwangerschaft vermutlich zur Kompensierung des erhöhten Insulinbedarfs hochreguliert wird (Abb. 3.14; Abb. 3.15) (Sorenson & Brelje, 1997; Tilg & Moschen, 2008).

Unabhängig von der wahrscheinlich positiven Rolle von OPG bezüglich der insulinproduzierenden β-Zellen zeigen Diabetiker signifikant höhere OPG-Konzentrationen im Serum als gesunde Patienten. Diese treten interessanterweise nur bei gleichzeitigem Vorhandensein diabetischer Folgeerkrankungen (z.B. Vaskulopathie, Osteopenie, Nephropathie) auf und wurden auch bei nicht-diabetischen Patienten mit entzündungsassoziierten Krankheiten (z.B. rheumatoider Arthritis) nachgewiesen. Als Ursache wird von einigen Autoren eine kompensatorische Hochregulation von OPG zur Eingrenzung weiterer Schäden spekuliert (Ziolkowska *et al.*, 2002; Jono *et al.*, 2002; Galluzzi *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2005; Secchiero *et al.*, 2006; Rasmussen *et al.*, 2006; Nabipour *et al.*, 2010).

## 4.2.2.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche physiologische Rolle das durch Zytokine sowie in der Schwangerschaft vermehrt exprimierte und sezernierte Protein OPG in pankreatischen β-Zellen spielt. Dabei konnte insbesondere ein OPG-ver-

mittelter Schutz vor einer IL-1β-induzierten β-Zellapoptose nachgewiesen werden. Über welche Signalproteine und Mechanismen Letzteres vermittelt wird, ist anhand der erhaltenen Resultate nicht vollständig ableitbar. Zur Beantwortung dieser Fragen bedarf es weiterer Versuche, in denen beispielsweise die Expression von Syndekan-1 oder strukturell ähnlicher Proteine, die in diesem Zusammenhang als Bindungspartner für OPG fungieren könnten, in β-Zellen untersucht werden. Um außerdem einzugrenzen, welche der sieben OPG-Domänen für die protektive Wirkung notwendig sind, könnte die hier beschriebene IL-1β-Stimulation mit anschließender Vitalitätsbestimmung an stabilen Ins-1E-OPG-Zellen wiederholt werden, die verkürzte OPG-Varianten bzw. OPG mit einer Deletion der favorisierten Heparinbindedomäne überexprimieren. Auch eine zusätzliche Blockierung dieser favorisierten OPG-Bindungsstelle durch im Überschuss eingesetzte Heparin- oder Syndekan-1-Moleküle könnte nähere Aufschlüsse über den pankreatischen Wirkungsmechanismus von OPG liefern.

Bezüglich des Wirkungsmechanismus von OPG konnte in der vorliegenden Arbeit eine OPG-vermittelte Suppression der IL-1β-induzierten Phosphorylierung der MAPK-Proteine JNK1/2, p38 und ERK1/2 postuliert werden. Ob der antiapoptotische Effekt von OPG tatsächlich auf einer Inaktivierung dieser MAP-Kinasen begründet ist, könnten Western-Blot-Analysen unter der Anwendung spezifischer MAPK-Inhibitoren (z.B. dem MEK-Inhibitor PD098059 oder dem p38-Inhibitor SB203580) bestätigen (Burns *et al.*, 2000). Da das proinflammatorische Zytokin IL-1β seine Effekte nicht nur über die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten MAP-Kinasen, sondern auch über den NF-κB-Signaltransduktionsweg vermittelt, stellte sich zudem die Frage, ob OPG seine Schutzfunktion auch durch Modulation des Transkriptionsfaktors NF-κB bewerkstelligt (Eizirik & Mandrup-Poulsen, 2001). Eine Antwort darauf könnten OPG-überexprimierende Ins-1E-Zellen liefern, deren NF-κB-Aktivierung nach IL-1β-Stimulation mit Hilfe von Western-Blot-Analysen oder indirekten Immunfluoreszenzfärbungen überprüft wird.

Es ist *in vitro* weder an primären Pankreasinseln noch an Insulinomzellen möglich längerfristige Veränderungen sowie den Einfluss systemischer Regulationsmechanismen und extrainsulärer Signale an  $\beta$ -Zellen zu imitieren. Weitere Untersuchungen bezüglich einer OPG-Wirkung auf Proliferation, Funktion und Apoptose der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen sind deshalb auch *in vivo* notwendig. Da OPG im Verlauf der Schwangerschaft hochreguliert wird, wäre es zunächst interessant, in einem Tiermodell für Gestationsdiabetes die zeitabhängige OPG-Expressionsrate in  $\beta$ -Zellen während sowie unmittelbar nach der Schwangerschaft zu bestimmen. Um direkte Aussagen über OPG-vermittelte Effekte hinsichtlich des Glukosemetabolismus zu ermöglichen, könnte sich in Zukunft eine  $\beta$ -zellspezifische, transgene OPG-Maus als hilfreich erweisen, für deren Herstellung im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits ein geeigneter Vektor konstruiert wurde (pcDNA3-MIP-OPG). Die Messung nüchterner Glukose- und Insulinspiegel, Tests auf Glukosetoleranz und Insulinsensitivität sowie immunhistochemische Bestimmungen von  $\beta$ -Zellmasse, Proliferation und Apoptose der  $\beta$ -Zellen sollten im direkten Vergleich zu genetisch unveränderten Mäusen in Zukunft nähere Aufschlüsse über eine physiologische Funktion von OPG in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen ermöglichen.

# 4.2.3 Molekulare Analyse der physiologischen Bedeutung von SOCS2 in den pankreatischen β-Zellen

Proteine der SOCS-Familie fungieren als klassische intrazelluläre Feedback-Inhibitoren verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren, die ihre Signale über den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg weiterleiten, und sind auf diese Weise an der Regulation einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt (Krebs & Hilton, 2001). SOCS-Proteine sind auch für den Glukosemetabolismus von Bedeutung. Diesbezüglich wurde in vitro gezeigt, dass die Proteine SOCS1 und SOCS3 eine antagonisierende Wirkung gegenüber den zytotoxischen Effekten proapoptotischer Zytokine aufweisen und dadurch insulinproduzierende β-Zellen vor einer Apoptose schützen (Cottet et al., 2001; Karlsen et al., 2004; Bruun et al., 2009; Jacobsen et al., 2009). Des Weiteren konnte durch SOCS1-Überexpression auch in vivo ein Schutz pankreatischer β-Zellen vor einer autoimmunvermittelten Zerstörung erzielt werden (Chong *et al.*, 2004). Dass einige SOCS-Proteine  $\beta$ -Zellen zusätzlich aufgrund ihrer regulatorischen Funktion bezüglich der GH-Signaltransduktion entscheidend beeinflussen, wurde bereits am Beispiel von SOCS3 demonstriert. Durch dessen Überexpression konnte eine Inhibierung der GH-vermittelten Stimulation von Insulingenexpression und β-Zellproliferation sowie eine daraus resultierende Reduktion der β-Zellmasse nachgewiesen werden (Ronn *et al.*, 2002; Lindberg *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde in Übereinstimmung mit einer anderen Studie gezeigt, dass in den pankreatischen β-Zellen auch eine Transkription von SOCS2 stattfindet (Abb. 3.10) (Santangelo et al., 2005). Daten über eine Funktion von SOCS2 im Glukosemetabolismus bzw. in β-Zellen sind bisher noch nicht bekannt. Neben postulierten Rollen von SOCS2 als Tumorsuppressor, als Regulator in der Entwicklung des zentralen Nervensystems oder in der Differenzierung von Osteoblasten, konnte eine SOCS2-vermittelte Regulation verschiedener Signalwege (z.B. IGF-1, PRL, LIF, EPO, IFN-α, IL-2, IL-3) aufgezeigt werden (Dey et al., 1998; Pezet et al., 1999; Zong et al., 2000; Jegalian & Wu, 2002; Tannahill et al., 2005; Rico-Bautista et al., 2006). Wie der auffällige Gigantismus von SOCS2-Knockout-Mäusen demonstriert, besitzt SOCS2 eine physiologische Schlüsselfunktion in der Kontrolle des postnatalen Wachstums, indem es die JAK-STAT-abhängige Signaltransduktion von GH reguliert (Metcalf et al., 2000; Greenhalgh et al., 2005). Interessanterweise besitzt SOCS2 diesbezüglich eine duale Funktion. Während es in niedrigen Konzentrationen als Inhibitor des "GH-Signalings" fungiert, wirkt es höher konzentriert eher stabilisierend bzw. verstärkend auf die Weiterleitung GH-vermittelter Signale (Favre et al., 1999). Dies konnte nicht nur in vitro, sondern auch in vivo durch den ähnlich ausgeprägten Gigantismus von SOCS2-Knockout-Mäusen und transgenen SOCS2-Mäusen verifiziert werden (Metcalf et al., 2000; Greenhalgh et al., 2002b). Bewerkstelligt wird dieser für die Wiederherstellung der GH-Sensitivität entscheidende SOCS2-Effekt vermutlich durch eine SOCS2-vermittelte negative Regulierung anderer als Inhibitoren des "GH-Signalings" fungierender SOCS-Proteine (z.B. SOCS3) (Tannahill et al., 2005; Piessevaux et al., 2006).

GH gilt nicht nur als Hauptregulator des postnatalen Wachstums, sondern ist, wie bereits erwähnt, ein wichtiger Wachstumsfaktor für die pankreatischen  $\beta$ -Zellen (Isaksson *et al.*, 1985; Nielsen *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2004). Aufgrund seiner stimulierenden Wirkung auf die Biosynthese und Sekretion von Insulin sowie die Proliferation der  $\beta$ -Zellen wird GH zusammen mit anderen Hormonen (z.B. PRL) während der Schwangerschaft zur effektiven Kompensierung des gesteigerten Insulinbedarfs hochreguliert (Brelje & Sorenson, 1991; Brelje *et al.*, 1993; Parsons *et al.*, 1995). Interessanterweise findet während der Schwangerschaft auch eine signifikante Hochregulation des GH- und PRL-Regulators SOCS2 statt, welche aufgrund des bekannten Feedback-Mechanismus zumindest teilweise in deren erhöhten Konzen-

trationen begründet sein könnte (Abb. 3. 29) (Davey *et al.*, 1999; Rieck *et al.*, 2009). In Anbetracht des dualen SOCS2-Effektes erschien sowohl eine GH- bzw. PRLinhibierende als auch eine unterstützende, positive Funktion von SOCS2 in insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen vorstellbar.

Aufgrund dieser Überlegungen und der bereits nachgewiesenen Funktion anderer SOCS-Proteine in  $\beta$ -Zellen stellten wir die Hypothese auf, dass auch SOCS2 eine entscheidende physiologische Rolle in pankreatischen  $\beta$ -Zellen spielt. Unterstützt wurde diese Hypothese durch zwei Arbeiten, welche einen engen Zusammenhang zwischen Einzelnukleotidpolymorphismen im SOCS2-Genlokus und dem Typ-2-Diabetes mellitus beim Menschen nachweisen konnten (Kato *et al.*, 2006; Rasche *et al.*, 2008).

## 4.2.3.1 Wirkung von SOCS2 auf die Proliferation pankreatischer β-Zellen

Neben der stimulierenden Wirkung von Nährstoffen wird die Proliferation insulinproduzierender β-Zellen durch eine Reihe von Hormonen induziert, zu denen auch das Wachstumshormon GH zählt (Nielsen et al., 1999). Nach Bindung seines Rezeptors (GH-R) vermittelt GH seine Signale über die Tyrosinkinase JAK2 und den Transkriptionsfaktor STAT5b, dessen Aktivierung nicht nur entscheidend für eine GH-vermittelte Stimulation der Präproinsulingenexpression ist, sondern auch Voraussetzung für die GH-induzierte Proliferation der  $\beta$ -Zellen (Galsgaard *et al.*, 1996; Friedrichsen et al., 2001). Letzteres wird durch die STAT5-initiierte Expression proliferativer und antiapoptotischer Zielgene reguliert (Friedrichsen et al., 2003; Fujinaka et al., 2007). Das Ausmaß der STAT5-Aktivierung beeinflusst deshalb entscheidend das Überleben pankreatischer β-Zellen und zumindest im Tiermodell auch die Anfälligkeit, einen Diabetes mellitus zu entwickeln (Jensen et al., 2005; Jackerott et al., 2006). Da die SOCS2-Genexpression durch die transkriptionelle Aktivität des GHstimulierten STAT5b initiiert wird und SOCS2 seine Regulatorfunktion auf Ebene dieses Transkriptionsfaktors ausübt, lässt sich eine wichtige Rolle von SOCS2 in den β-Zellen und der Pathogenese des Typ-2-Diabetes mellitus vermuten (Davey et al., 1999; Ram & Waxman, 1999; Greenhalgh et al., 2002a; Vidal et al., 2007).

Um den Einfluss von SOCS2 auf die  $\beta$ -Zellproliferation zu untersuchen, wurde zunächst die  $\beta$ -Zellmasse von SOCS2-Knockout-Mäusen bestimmt. Im Vergleich zu

C57BL/6-Mäusen zeigten diese eine größere  $\beta$ -Zellmasse (Daten nicht gezeigt). Da jedoch bei SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäusen ein Gigantismus mit allgemeiner Organomegalie vorliegt, ist die körpergewichtsbezogene  $\beta$ -Zellmasse als physiologisch relevanter Parameter anzusehen (Metcalf *et al.*, 2000). In diesem Wert ergaben sich allerdings keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.38). Es wurde angenommen, dass die proportionale Zunahme der  $\beta$ -Zellmasse in SOCS2-Knockout-Tieren entweder Folge eines indirekten Anpassungsvorganges an die insgesamt größere Maus darstellt oder angesichts des fehlenden GH-Inhibitors SOCS2 auf einem gesteigerten "GH-Signaling" in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen selbst basiert.

Als erster Schritt zur Klärung dieser Frage wurden entsprechende in vitro-Versuche an Ins-1E-Zellen unter Einbeziehung einer GH-Stimulation durchgeführt. Durch eine Suppression bzw. Überexpression von SOCS2 konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Ins-1E-Proliferationsrate nachgewiesen werden (Abb. 3.33). In Übereinstimmung mit Daten von Lindberg et al., welche an primären SOCS2-überexprimierenden 
ß-Zellen lediglich eine tendenzielle Abschwächung der GH-induzierten Proliferation beschrieben, war kein signifikanter Einfluss von SOCS2 auf die GH-stimulierten Ins-1E-Zellen feststellbar (Lindberg et al., 2005). Dennoch wurde eine SOCS2-abhängige Verschiebung der für die STAT5-Aktivierung notwendigen GH-Dosis hin zu höheren Konzentrationen detektiert (Abb. 3.35). Aufgrund der Funktion von SOCS2 als GH-Inhibitor war die beobachtete Beeinflussung der SOCS2-Überexpression durchaus zu erwarten. Ähnlich wie bei der SOCS2-Gensuppression ist jedoch grundsätzlich auch bei dieser Ergebnisinterpretation zu hinterfragen, ob derartig hohe Konzentrationen des überexprimierten Inhibitors SOCS2 physiologisch sind, und das Ergebnis somit nicht als Nebeneffekt der konstitutiven Überexpression auftritt. Weshalb Ins-1E- und Ins-1E-SOCS2-Zellen nach einer zeitabhängigen GH-Stimulation eine ähnlich starke STAT5-Phosphorylierung zeigten, ist möglicherweise auf der Applikation einer im Sättigungsbereich liegenden GH-Dosis begründet, die unabhängig von SOCS2 nach einer einstündiger Stimulation zur maximalen STAT5-Aktivität führte (Abb. 3.34).

Insgesamt legen diese Daten nahe, dass SOCS2 keinen dominanten bzw. keinen nicht-redundanten Einfluss auf die proliferative GH-STAT5b-Signaltransduktion in β-Zellen ausübt. Als wahrscheinlichste Erklärung für diese Beobachtung kommt die ausgeprägte Redundanz zwischen den verschiedenen Mitgliedern der SOCS-

Proteinfamilie in Frage. Diesbezüglich wurde an Ins-1E-Zellen gezeigt, dass durch SOCS2-Überexpression eine Reduktion der basalen und vor allem der GHinduzierten SOCS3-Expression hervorgerufen wird (Abb. 3.36; Abb. 3.37). Ursache dafür könnte die von SOCS2 im Rahmen einer negativen Rückkopplung verursachte Inhibierung der JAK/STAT-abhängigen SOCS3-Expression sein. Auch eine SOCS2vermittelte Ubiquitinierung und der daran anschließende proteosomale Abbau von SOCS3 sind möglich (Tannahill *et al.*, 2005; Piessevaux *et al.*, 2006). Daten von Rønn *et al.* zeigten, dass SOCS3 nach GH-Stimulation sowohl die STAT5-DNA-Bindungskapazität in RIN5-AH-Zellen als auch die Proliferation von Ins-1E-Zellen inhibierten kann (Ronn *et al.*, 2002). Somit erscheint SOCS3 durchaus in der Lage, Effekte von SOCS2 in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen zu übernehmen. Als ein weiterer Kandidat dafür gilt das Protein CIS, welches innerhalb der SOCS-Familie mit einer Aminosäurenidentität von etwa 38 % die höchste Sequenzhomologie zu SOCS2 aufweist (Starr *et al.*, 1997). Zur Beantwortung dieser Fragen sind jedoch zukünftig weitere Untersuchungen notwendig.

Zusammenfassend deuten die in diesem Abschnitt gewonnenen Resultate darauf hin, dass SOCS2 in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen keine nicht-redundante Wirkung auf den GH-JAK/STAT-Weg ausübt und die  $\beta$ -Zellproliferation nicht direkt beeinflusst. Die expandierte  $\beta$ -Zellmasse von SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäusen ist deshalb wahrscheinlich auf indirekte, systemische Anpassungsmechanismen zurückzuführen.

## 4.2.3.2 Physiologische Funktion von SOCS2 in der zytokininduzierten Apoptose insulinproduzierender β-Zellen

Das basale Expressionsniveau der Proteine SOCS1, SOCS2 und SOCS3 ist in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen relativ gering, wird aber durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  innerhalb weniger Stunden hochreguliert (Abb. 3.39) (Santangelo *et al.*, 2005). Aufgrund der Tatsache, dass SOCS1 und SOCS3 die Signaltransduktion der genannten Zytokine im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus inhibieren und dadurch die  $\beta$ -Zellen vor einer Apoptose schützen, wurde eine ähnliche Funktion von SOCS2 in den  $\beta$ -Zellen vermutet (Cottet *et al.*, 2001; Karlsen *et al.*, 2004; Bruun *et al.*, 2009; Jacobsen *et al.*, 2009). Die daraufhin an C57BL/6- und SOCS2<sup>-/-</sup>-Pankreasinseln durchgeführten *in vitro*-Versuche zeigten keine deutlichen Vitalitätsunterschiede in der zytokininduzierten Apoptoserate. Damit

übereinstimmend bewirkte weder eine siRNA-vermittelte Suppression noch eine stabile Überexpression von SOCS2 einen signifikanten Einfluss auf die Vitalität IL-1β-stimulierter Ins-1E-Zellen (Abb. 3.40). Während der protektive Effekt von SOCS3 auf einer Inhibierung des zytokinaktivierten Transkriptionsfaktors NF-KB und der MAPK-Proteine JNK, ERK1/2 und p38 basiert, konnte analog dazu kein Einfluss von SOCS2 auf die IL-1β-vermittelte Aktivierung der MAP-Kinasen JNK und ERK1/2 detektiert werden (Abb. 3.41) (Bruun et al., 2009). Allerdings konnte eher unerwartet eine SOCS2-abhängige Unterstützung der Stresskinase p38 im Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 3.41). Dennoch erzielte diese keinen sichtbaren Einfluss auf die Apoptoserate der Ins-1E-Zellen, so dass auch unter der Voraussetzung einer vergleichbar starken physiologischen SOCS2-Induktion andere Stimuli überwiegen und SOCS2 letztlich keine dominante Wirkung auf die Apoptose pankreatischer β-Zellen ausübt (Abb. 3.40B). Diese in vitro gewonnene Erkenntnis konnte auch in vivo an C57BL/6- und SOCS2-Knockout-Mäusen durch Induktion einer zytokinvermittelten β-Zellapoptose bestätigt werden. Dabei waren sowohl die Kinetik als auch die Geschlechtsspezifität der Entwicklung eines Autoimmundiabetes im "Multiple-lowdose-STZ"-Modell von wildtypischen C57BL/6- und SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäusen identisch (Abb. 3.42).

## 4.2.3.3 Einfluss von SOCS2 auf den Glukosemetabolismus

Neben einer adäquaten Biosynthese und Prozessierung von Insulin ist die Insulinsekretionsfähigkeit der einzelnen  $\beta$ -Zellen entscheidend für eine effiziente Regulation des Blutzuckerspiegels. Um den Einfluss von SOCS2 auf die Funktion pankreatischer  $\beta$ -Zellen zu untersuchen, wurde *in vitro* sowohl von transient SOCS2-transfizierten Ins-1E-Zellen als auch von C57BL/6- und SOCS2<sup>-/-</sup>-Pankreasinseln die glukoseabhängige Insulinsekretion getestet. Dabei erbrachte die transiente Überexpression von SOCS2 in Ins-1E-Zellen keine konsistenten, signifikanten Änderungen der glukoseabhängigen Insulinsekretion (Abb. 3.43A). Dementsprechend hatte auch ein Fehlen von SOCS2 in SOCS2-Knockout-Inseln keinen Einfluss auf die  $\beta$ -Zellfunktion (Abb. 3.43B). Letzteres konnte auch *in vivo* im Rahmen von Glukosetoleranztests bestätigt werden. Da jedoch SOCS2<sup>-/-</sup>-Weibchen unmittelbar nach dem Glukosebolus einen signifikant erhöhten Blutzuckerspiegel zeigten, welcher nach 30 min bzw. 60 min wieder normalisiert werden konnte, ließ

sich zunächst eine Insulinresistenz oder eine Störung der ersten Insulinsekretionsphase vermuten (Abb. 3.44A-B; Abb. 3.44E). Dies konnte aber nach Durchführung von Insulintoleranztests und intravenösen Glukosetoleranztests (iv-GTT) ausgeschlossen werden (Abb. 3.45A-B; Abb. 3.46A). Ebenso erweckten SOCS2<sup>-/-</sup>-Männchen im intraperitonealen Glukosetoleranztest (ip-GTT) den Anschein eines für Typ-2-Diabetiker charakteristischen Fehlens der akuten Insulinfreisetzung, welches kurzfristig einen leicht erhöhten Blutzuckerspiegel verursachte (Abb. 3.44C-D; Abb. 3.44F) (Surampudi *et al.*, 2009). Im anschließenden iv-GTT wiesen sie allerdings eine relativ normale Blutzuckerkurve ohne signifikante Unterschiede in den AUC-Werten ("area under the curve") sowie ein physiologisches, biphasisches Sekretionsprofil auf (Abb. 3.45C-D). Veränderungen in β-Zellfunktion und Insulinempfindlichkeit konnten insgesamt bei SOCS2-Knockout-Mäusen nicht gefunden werden. Deren höhere Blutzuckerwerte früh im ip-GTT sind demnach am ehesten auf eine unterschiedliche Resorptionskinetik der injizierten Glukose zurückzuführen.

Wie durch Studien mit SOCS1, SOCS3 und SOCS6 gezeigt wurde, sind einige Proteine der SOCS-Familie an der Entstehung und Verstärkung einer peripheren Insulinresistenz beteiligt. Verursacht wird dies nach zytokin- oder GH-induzierter SOCS-Expression durch Bindung des Insulinrezeptors und der daraus resultierenden Blockierung dessen Kinaseaktivität. Zusätzlich wird eine Beeinträchtigung des "Insulinsignalings" durch einen SOCS-Box-vermittelten Abbau der Insulinrezeptorsubstrate IRS-1 und IRS-2 hervorgerufen (Emanuelli et al., 2000; Mooney et al., 2001; Emanuelli et al., 2004; Ueki et al., 2004; Howard & Flier, 2006). Da Rui et al. in vitro nachwiesen, dass SOCS2 nicht in der Lage ist, gebundene IRS-Moleküle abzubauen, wurde zunächst ein Zusammenhang zwischen SOCS2 und der Entwicklung einer Insulinresistenz ausgeschlossen (Rui et al., 2002). Dazu entgegengesetzt wurde von einer anderen Arbeitsgruppe aufgrund der tendenziell verbesserten Insulinantwort in Hepatozyten von SOCS2-Knockout-Mäusen vermutet, dass SOCS2 ebenso an einer negativen Regulation des "Insulinsignalings" beteiligt ist (Rico-Bautista et al., 2005). Durch die in dieser Arbeit an C57BL/6- und SOCS2-Knockout-Mäusen durchgeführten Insulintoleranztests wurde nachgewiesen, dass sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen ein Fehlen von SOCS2 die Insulinsensitivität nicht beeinträchtigt (Abb. 3.46). Diesbezüglich wurden auch von Rico-Bautista et al., welche metabolische Änderungen an männlichen SOCS2<sup>-/-</sup>-Mäusen

untersuchten, keine Abnormalitäten im Glukose- und Insulintoleranztest festgestellt (Rico-Bautista *et al.*, 2005). Somit lässt sich insgesamt in Übereinstimmung mit den *in vitro*-Daten folgern, dass SOCS2 keinen signifikanten Einfluss auf die Funktion der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen und den Glukosemetabolismus ausübt und im Gegensatz zu den Proteinen SOCS1 und SOCS3 höchstwahrscheinlich keine Insulinresistenz der peripheren Gewebe verursacht.

#### 4.2.3.4 Ausblick

Im letzten Abschnitt der vorliegenden Arbeit konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass das während der Schwangerschaft in Pankreasinseln signifikant stärker exprimierte SOCS2 die Proliferation, Funktion und Apoptose der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen nicht merklich beeinflusst. Obwohl SOCS2 keinen auffälligen Phänotyp im Glukosemetabolismus hervorruft, ist dennoch eine Funktion von SOCS2 in Kombination mit anderen SOCS-Proteinen in  $\beta$ -Zellen durchaus wahrscheinlich (Kato *et al.*, 2006; Rasche *et al.*, 2008). Weitere *in vitro*-Versuche, welche zukünftig die Expression mehrerer SOCS-Proteine gleichzeitig modulieren, könnten sich hier als hilfreich erweisen. Zusätzliche *in vivo*-Versuche mit  $\beta$ -zellspezifischen SOCS-Knockout- bzw. transgenen Mäusen könnten in Zukunft ebenfalls nähere Erkenntnisse über eine potentielle SOCS2-Funktion in den  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas ermöglichen. So könnte auch letztendlich zwischen internen  $\beta$ -Zelleffekten von SOCS2 und systemischen Funktionen unterschieden werden.

## 5. Literaturverzeichnis

Ahima,R.S., Prabakaran,D., Mantzoros,C., Qu,D., Lowell,B., Maratos-Flier,E. & Flier,J.S. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 382: 250-252.

Alberti,G., Zimmet,P., Shaw,J., Bloomgarden,Z., Kaufman,F. & Silink,M. (2004). Type 2 diabetes in the young: the evolving epidemic: the international diabetes federation consensus workshop. *Diabetes Care*, 27: 1798-1811.

Alberti,K.G. & Zimmet,P.Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet.Med.*, 15: 539-553.

Amaral,M.E., Cunha,D.A., Anhe,G.F., Ueno,M., Carneiro,E.M., Velloso,L.A., Bordin,S. & Boschero,A.C. (2004). Participation of prolactin receptors and phosphatidylinositol 3-kinase and MAP kinase pathways in the increase in pancreatic islet mass and sensitivity to glucose during pregnancy. *J.Endocrinol.*, 183: 469-476.

Ammendrup,A., Maillard,A., Nielsen,K., Aabenhus,A.N., Serup,P., Dragsbaek,M.O., Mandrup-Poulsen,T. & Bonny,C. (2000). The c-Jun amino-terminal kinase pathway is preferentially activated by interleukin-1 and controls apoptosis in differentiating pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 49: 1468-1476.

Andersen, N.A., Larsen, C.M. & Mandrup-Poulsen, T. (2000). TNFalpha and IFNgamma potentiate IL-1beta induced mitogen activated protein kinase activity in rat pancreatic islets of Langerhans. *Diabetologia*, 43: 1389-1396.

Araki, T. & Milbrandt, J. (2003). ZNRF proteins constitute a family of presynaptic E3 ubiquitin ligases. *J.Neurosci.*, 23: 9385-9394.

Arber, W. (1978). Restriction endonucleases. Angew. Chem. Int. Ed Engl., 17: 73-79.

Asfari,M., Janjic,D., Meda,P., Li,G., Halban,P.A. & Wollheim,C.B. (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*, 130: 167-178.

Ashcroft,S.J. & Randle,P.J. (1968). Control of insulin release by glucose. *Proc.R.Soc.Med.*, 61: 814-815.

Banting, F.G. & Best, C.H. (1990). Pancreatic extracts. 1922. J.Lab Clin.Med., 115: 254-272.

Barnett, A.H., Eff, C., Leslie, R.D. & Pyke, D.A. (1981). Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia*, 20: 87-93.

Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N. & Kelly, P.A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.*, 19: 225-268.

Bone,A.J. & Taylor,K.W. (1976). Mitabolic adaptation to pregnancy shown by increased biosynthesis of insulin in islets of Langerhans isolated from pregnant rat. *Nature*, 262: 501-502.

Bonner-Weir, S. (2000a). Islet growth and development in the adult. *J.Mol.Endocrinol.*, 24: 297-302.

Bonner-Weir,S. (2000b). Life and death of the pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol.Metab*, 11: 375-378.

Bonny, C., Oberson, A., Negri, S., Sauser, C. & Schorderet, D.F. (2001). Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death. *Diabetes*, 50: 77-82.

Boquist,L., Hellman,B., Lernmark,A. & Taljedal,I.B. (1974). Influence of the mutation "diabetes" on insulin release and islet morphology in mice of different genetic backgrounds. *J.Cell Biol.*, 62: 77-89.

Boura-Halfon, S. & Zick, Y. (2009). Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, 296: E581-E591.

Bray, G.A. (1977). The Zucker-fatty rat: a review. Fed. Proc., 36: 148-153.

Brelje,T.C., Scharp,D.W., Lacy,P.E., Ogren,L., Talamantes,F., Robertson,M., Friesen,H.G. & Sorenson,R.L. (1993). Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology*, 132: 879-887.

Brelje,T.C. & Sorenson,R.L. (1991). Role of prolactin versus growth hormone on islet B-cell proliferation in vitro: implications for pregnancy. *Endocrinology*, 128: 45-57.

Brenner, M.B., Gromada, J., Efanov, A.M., Bokvist, K. & Mest, H.J. (2003). Restoration of first-phase insulin secretion by the imidazoline compound LY374284 in pancreatic islets of diabetic db/db mice. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1009: 332-340.

Brockenbrough, J.S., Weir, G.C. & Bonner-Weir, S. (1988). Discordance of exocrine and endocrine growth after 90% pancreatectomy in rats. *Diabetes*, 37: 232-236.

Bruun,C., Heding,P.E., Ronn,S.G., Frobose,H., Rhodes,C.J., Mandrup-Poulsen,T. & Billestrup,N. (2009). Suppressor of cytokine signalling-3 inhibits Tumor necrosis factor-alpha induced apoptosis and signalling in beta cells. *Mol.Cell Endocrinol.*, 311: 32-38.

Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C.R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H.L., Xu, W., Lacey, D.L., Boyle, W.J. & Simonet, W.S. (1998). Osteoprotegerindeficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.*, 12: 1260-1268.

Burkart, V. & Kolb, H. (1996). Macrophages in islet destruction in autoimmune diabetes mellitus. *Immunobiology*, 195: 601-613.

Burnette,W.N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal.Biochem.*, 112: 195-203.

Burns,C.J., Squires,P.E. & Persaud,S.J. (2000). Signaling through the p38 and p42/44 mitogen-activated families of protein kinases in pancreatic beta-cell proliferation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 268: 541-546.

Butler,A.E., Janson,J., Bonner-Weir,S., Ritzel,R., Rizza,R.A. & Butler,P.C. (2003). Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*, 52: 102-110.

Campfield,L.A., Smith,F.J., Guisez,Y., Devos,R. & Burn,P. (1995). Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, 269: 546-549.

Cardozo,A.K., Kruhoffer,M., Leeman,R., Orntoft,T. & Eizirik,D.L. (2001). Identification of novel cytokine-induced genes in pancreatic beta-cells by high-density oligonucleotide arrays. *Diabetes*, 50: 909-920.

Catalano, P.M., Roman-Drago, N.M., Amini, S.B. & Sims, E.A. (1998). Longitudinal changes in body composition and energy balance in lean women with normal and abnormal glucose tolerance during pregnancy. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 179: 156-165.

Chan,S.J., Keim,P. & Steiner,D.F. (1976). Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 73: 1964-1968.

Chang-Chen,K.J., Mullur,R. & Bernal-Mizrachi,E. (2008). Beta-cell failure as a complication of diabetes. *Rev.Endocr.Metab Disord.*, 9: 329-343.

Chen,H., Charlat,O., Tartaglia,L.A., Woolf,E.A., Weng,X., Ellis,S.J., Lakey,N.D., Culpepper,J., Moore,K.J., Breitbart,R.E., Duyk,G.M., Tepper,R.I. & Morgenstern,J.P. (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*, 84: 491-495.

Chong,M.M., Chen,Y., Darwiche,R., Dudek,N.L., Irawaty,W., Santamaria,P., Allison,J., Kay,T.W. & Thomas,H.E. (2004). Suppressor of cytokine signaling-1 overexpression protects pancreatic beta cells from CD8+ T cell-mediated autoimmune destruction. *J.Immunol.*, 172: 5714-5721.

Chung,C.D., Liao,J., Liu,B., Rao,X., Jay,P., Berta,P. & Shuai,K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, 278: 1803-1805.

Cnop,M., Welsh,N., Jonas,J.C., Jorns,A., Lenzen,S. & Eizirik,D.L. (2005). Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*, 54 Suppl 2: S97-107.

Cohen,S.N., Chang,A.C. & Hsu,L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 69: 2110-2114.

Coleman, D.L. & Hummel, K.P. (1973). The influence of genetic background on the expression of the obese (Ob) gene in the mouse. *Diabetologia*, 9: 287-293.

Coles,H.S., Burne,J.F. & Raff,M.C. (1993). Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. *Development*, 118: 777-784.

Cottet,S., Dupraz,P., Hamburger,F., Dolci,W., Jaquet,M. & Thorens,B. (2001). SOCS-1 protein prevents Janus Kinase/STAT-dependent inhibition of beta cell insulin gene transcription and secretion in response to interferon-gamma. *J.Biol.Chem.*, 276: 25862-25870.

Creutzfeldt, W. (2001). The entero-insular axis in type 2 diabetes - incretins as therapeutic agents. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes*, 109 Suppl 2: S288-S303.

Dalpke,A., Heeg,K., Bartz,H. & Baetz,A. (2008). Regulation of innate immunity by suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins. *Immunobiology*, 213: 225-235.

Daneman, D. (2006). Type 1 diabetes. Lancet, 367: 847-858.

Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M. & Stark, G.R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264: 1415-1421.

Davey, H.W., McLachlan, M.J., Wilkins, R.J., Hilton, D.J. & Adams, T.E. (1999). STAT5b mediates the GH-induced expression of SOCS-2 and SOCS-3 mRNA in the liver. *Mol.Cell Endocrinol.*, 158: 111-116.

Davidson,H.W., Rhodes,C.J. & Hutton,J.C. (1988). Intraorganellar calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic beta cell via two distinct site-specific endopeptidases. *Nature*, 333: 93-96.

de Koning, E.J., Bonner-Weir, S. & Rabelink, T.J. (2008). Preservation of beta-cell function by targeting beta-cell mass. *Trends Pharmacol.Sci.*, 29: 218-227.

Del,P.S. & Marchetti,P. (2004). Beta- and alpha-cell dysfunction in type 2 diabetes. *Horm.Metab Res.*, 36: 775-781.

Deng,S., Vatamaniuk,M., Huang,X., Doliba,N., Lian,M.M., Frank,A., Velidedeoglu,E., Desai,N.M., Koeberlein,B., Wolf,B., Barker,C.F., Naji,A., Matschinsky,F.M. & Markmann,J.F. (2004). Structural and functional abnormalities in the islets isolated from type 2 diabetic subjects. *Diabetes*, 53: 624-632.

Derewenda,U., Derewenda,Z., Dodson,G.G., Hubbard,R.E. & Korber,F. (1989). Molecular structure of insulin: the insulin monomer and its assembly. *Br.Med.Bull.*, 45: 4-18.

Dey,B.R., Spence,S.L., Nissley,P. & Furlanetto,R.W. (1998). Interaction of human suppressor of cytokine signaling (SOCS)-2 with the insulin-like growth factor-I receptor. *J.Biol.Chem.*, 273: 24095-24101.

Diehl,G.E., Yue,H.H., Hsieh,K., Kuang,A.A., Ho,M., Morici,L.A., Lenz,L.L., Cado,D., Riley,L.W. & Winoto,A. (2004). TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity.*, 21: 877-889.

Dodson,G. & Steiner,D. (1998). The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, 8: 189-194.

Dominici, F.P., Argentino, D.P., Munoz, M.C., Miquet, J.G., Sotelo, A.I. & Turyn, D. (2005). Influence of the crosstalk between growth hormone and insulin signalling on the modulation of insulin sensitivity. *Growth Horm.IGF.Res.*, 15: 324-336.

Donath,M.Y., Ehses,J.A., Maedler,K., Schumann,D.M., Ellingsgaard,H., Eppler,E. & Reinecke,M. (2005). Mechanisms of beta-cell death in type 2 diabetes. *Diabetes*, 54 Suppl 2: S108-S113.

Dor,Y., Brown,J., Martinez,O.I. & Melton,D.A. (2004). Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*, 429: 41-46.

Dunn,M.F. (2005). Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer - a review. *Biometals*, 18: 295-303.

Eizirik, D.L., Cardozo, A.K. & Cnop, M. (2008). The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr. Rev.*, 29: 42-61.

Eizirik, D.L. & Mandrup-Poulsen, T. (2001). A choice of death - the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*, 44: 2115-2133.

Elghazi,L., Balcazar,N. & Bernal-Mizrachi,E. (2006). Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic beta-cell mass and function. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 38: 157-163.

Ellingsgaard,H., Ehses,J.A., Hammar,E.B., Van,L.L., Quintens,R., Martens,G., Kerr-Conte,J., Pattou,F., Berney,T., Pipeleers,D., Halban,P.A., Schuit,F.C. & Donath,M.Y. (2008). Interleukin-6 regulates pancreatic alpha-cell mass expansion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 105: 13163-13168.

Emanuelli,B., Glondu,M., Filloux,C., Peraldi,P. & Van,O.E. (2004). The potential role of SOCS-3 in the interleukin-1beta-induced desensitization of insulin signaling in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 53 Suppl 3: S97-S103.

Emanuelli,B., Peraldi,P., Filloux,C., Sawka-Verhelle,D., Hilton,D. & Van,O.E. (2000). SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling. *J.Biol.Chem.*, 275: 15985-15991.

Emery,J.G., McDonnell,P., Burke,M.B., Deen,K.C., Lyn,S., Silverman,C., Dul,E., Appelbaum,E.R., Eichman,C., DiPrinzio,R., Dodds,R.A., James,I.E., Rosenberg,M., Lee,J.C. & Young,P.R. (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J.Biol.Chem.*, 273: 14363-14367.

Endo,T.A., Masuhara,M., Yokouchi,M., Suzuki,R., Sakamoto,H., Mitsui,K., Matsumoto,A., Tanimura,S., Ohtsubo,M., Misawa,H., Miyazaki,T., Leonor,N., Taniguchi,T., Fujita,T., Kanakura,Y., Komiya,S. & Yoshimura,A. (1997). A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature*, 387: 921-924.

Favre,H., Benhamou,A., Finidori,J., Kelly,P.A. & Edery,M. (1999). Dual effects of suppressor of cytokine signaling (SOCS-2) on growth hormone signal transduction. *FEBS Lett.*, 453: 63-66.

Fehmann,H.C., Peiser,C., Bode,H.P., Stamm,M., Staats,P., Hedetoft,C., Lang,R.E. & Goke,B. (1997). Leptin: a potent inhibitor of insulin secretion. *Peptides*, 18: 1267-1273.

Friedrichsen, B.N., Galsgaard, E.D., Nielsen, J.H. & Moldrup, A. (2001). Growth hormone- and prolactin-induced proliferation of insulinoma cells, INS-1, depends on activation of STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5). *Mol. Endocrinol.*, 15: 136-148.

Friedrichsen, B.N., Richter, H.E., Hansen, J.A., Rhodes, C.J., Nielsen, J.H., Billestrup, N. & Moldrup, A. (2003). Signal transducer and activator of transcription 5 activation is sufficient to drive transcriptional induction of cyclin D2 gene and proliferation of rat pancreatic beta-cells. *Mol.Endocrinol.*, 17: 945-958.

Fujinaka,Y., Takane,K., Yamashita,H. & Vasavada,R.C. (2007). Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and Bcl-XL upregulation. *J.Biol.Chem.*, 282: 30707-30717.

Galluzzi,F., Stagi,S., Salti,R., Toni,S., Piscitelli,E., Simonini,G., Falcini,F. & Chiarelli,F. (2005). Osteoprotegerin serum levels in children with type 1 diabetes: a potential modulating role in bone status. *Eur.J.Endocrinol.*, 153: 879-885.

Galsgaard,E.D., Gouilleux,F., Groner,B., Serup,P., Nielsen,J.H. & Billestrup,N. (1996). Identification of a growth hormone-responsive STAT5-binding element in the rat insulin 1 gene. *Mol.Endocrinol.*, 10: 652-660.

Gapp,D.A., Leiter,E.H., Coleman,D.L. & Schwizer,R.W. (1983). Temporal changes in pancreatic islet composition in C57BL/6J-db/db (diabetes) mice. *Diabetologia*, 25: 439-443.

Gerich, J.E. (2003). Contributions of insulin-resistance and insulin-secretory defects to the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Mayo Clin.Proc.*, 78: 447-456.

Gerich, J.E. (2000). Insulin resistance is not necessarily an essential component of type 2 diabetes. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 85: 2113-2115.

Giani,G., Janka,H.U., Hauner,H., Standl,E., Schiel,R., Neu,A., Rathmann,W., Rosenbauer,J. (2004). Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) - Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland.

Gillespie,K.M., Bain,S.C., Barnett,A.H., Bingley,P.J., Christie,M.R., Gill,G.V. & Gale,E.A. (2004). The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes. *Lancet*, 364: 1699-1700.

Goto,Y., Kakizaki,M. & Masaki,N. (1976). Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J.Exp.Med.*, 119: 85-90.

Grattan, D.R., Steyn, F.J., Kokay, I.C., Anderson, G.M. & Bunn, S.J. (2008). Pregnancyinduced adaptation in the neuroendocrine control of prolactin secretion. *J.Neuroendocrinol.*, 20: 497-507.

Greenhalgh,C.J. & Hilton,D.J. (2001). Negative regulation of cytokine signaling. *J.Leukoc.Biol.*, 70: 348-356.

Greenhalgh,C.J., Bertolino,P., Asa,S.L., Metcalf,D., Corbin,J.E., Adams,T.E., Davey,H.W., Nicola,N.A., Hilton,D.J. & Alexander,W.S. (2002a). Growth enhancement in suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS-2)-deficient mice is dependent on signal transducer and activator of transcription 5b (STAT5b). *Mol.Endocrinol.*, 16: 1394-1406.

Greenhalgh,C.J., Metcalf,D., Thaus,A.L., Corbin,J.E., Uren,R., Morgan,P.O., Fabri,L.J., Zhang,J.G., Martin,H.M., Willson,T.A., Billestrup,N., Nicola,N.A., Baca,M., Alexander,W.S. & Hilton,D.J. (2002b). Biological evidence that SOCS-2 can act either as an enhancer or suppressor of growth hormone signaling. *J.Biol.Chem.*, 277: 40181-40184.

Greenhalgh,C.J., Rico-Bautista,E., Lorentzon,M., Thaus,A.L., Morgan,P.O., Willson,T.A., Zervoudakis,P., Metcalf,D., Street,I., Nicola,N.A., Nash,A.D., Fabri,L.J., Norstedt,G., Ohlsson,C., Flores-Morales,A., Alexander,W.S. & Hilton,D.J. (2005). SOCS2 negatively regulates growth hormone action in vitro and in vivo. *J.Clin.Invest*, 115: 397-406.

Grill,V. & Bjorklund,A. (2001). Overstimulation and beta-cell function. *Diabetes*, 50 Suppl 1: S122-S124.

Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K. & Friedman, J.M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269: 543-546.

Hien, P. & Böhm, B. (2007). Diabetes-Handbuch - Eine Anleitung für Praxis und Klinik. Springer, 5. Auflage: 91-117.

Hilton, D.J. (1999). Negative regulators of cytokine signal transduction. *Cell Mol.Life Sci.*, 55: 1568-1577.

Hofbauer,L.C. & Heufelder,A.E. (2001). Role of receptor activator of nuclear factorkappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J.Mol.Med.*, 79: 243-253.

Holen, I. & Shipman, C.M. (2006). Role of osteoprotegerin (OPG) in cancer. *Clin.Sci.(Lond)*, 110: 279-291.

Howard, J.K., Cave, B.J., Oksanen, L.J., Tzameli, I., Bjorbaek, C. & Flier, J.S. (2004). Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat.Med.*, 10: 734-738.

Howard, J.K. & Flier, J.S. (2006). Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol.Metab*, 17: 365-371.

Hsu,H., Lacey,D.L., Dunstan,C.R., Solovyev,I., Colombero,A., Timms,E., Tan,H.L., Elliott,G., Kelley,M.J., Sarosi,I., Wang,L., Xia,X.Z., Elliott,R., Chiu,L., Black,T., Scully,S., Capparelli,C., Morony,S., Shimamoto,G., Bass,M.B. & Boyle,W.J. (1999). Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96: 3540-3545.

Huang,S. & Czech,M.P. (2007). The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab*, 5: 237-252.

Hummel,K.P., Coleman,D.L. & Lane,P.W. (1972). The influence of genetic background on expression of mutations at the diabetes locus in the mouse. I. C57BL-KsJ and C57BL-6J strains. *Biochem.Genet.*, 7: 1-13.

Hummel,K.P., Dickie,M.M. & Coleman,D.L. (1966). Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science*, 153: 1127-1128.

Imai,J., Katagiri,H., Yamada,T., Ishigaki,Y., Suzuki,T., Kudo,H., Uno,K., Hasegawa,Y., Gao,J., Kaneko,K., Ishihara,H., Niijima,A., Nakazato,M., Asano,T., Minokoshi,Y. & Oka,Y. (2008). Regulation of pancreatic beta cell mass by neuronal signals from the liver. *Science*, 322: 1250-1254.

Ingalls,A.M., Dickie,M.M. & Snell,G.D. (1950). Obese, a new mutation in the house mouse. *J.Hered.*, 41: 317-318.

Isaksson,O.G., Eden,S. & Jansson,J.O. (1985). Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. *Annu.Rev.Physiol*, 47: 483-499.

Jackerott, M., Moldrup, A., Thams, P., Galsgaard, E.D., Knudsen, J., Lee, Y.C. & Nielsen, J.H. (2006). STAT5 activity in pancreatic beta-cells influences the severity of diabetes in animal models of type 1 and 2 diabetes. *Diabetes*, 55: 2705-2712.

Jacobsen, M.L., Ronn, S.G., Bruun, C., Larsen, C.M., Eizirik, D.L., Mandrup-Poulsen, T. & Billestrup, N. (2009). IL-1beta-induced chemokine and Fas expression are inhibited by suppressor of cytokine signalling-3 in insulin-producing cells. *Diabetologia*, 52: 281-288.

Jansen, A., Homo-Delarche, F., Hooijkaas, H., Leenen, P.J., Dardenne, M. & Drexhage, H.A. (1994). Immunohistochemical characterization of monocytesmacrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes*, 43: 667-675.

Jegalian, A.G. & Wu, H. (2002). Differential roles of SOCS family members in EpoR signal transduction. *J.Interferon Cytokine Res.*, 22: 853-860.

Jensen, J., Galsgaard, E.D., Karlsen, A.E., Lee, Y.C. & Nielsen, J.H. (2005). STAT5 activation by human GH protects insulin-producing cells against interleukin-1beta, interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha-induced apoptosis independent of nitric oxide production. *J.Endocrinol.*, 187: 25-36.

Jensen, M.V., Joseph, J.W., Ronnebaum, S.M., Burgess, S.C., Sherry, A.D. & Newgard, C.B. (2008). Metabolic cycling in control of glucose-stimulated insulin secretion. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, 295: E1287-E1297.

Jetton,T.L., Lausier,J., Larock,K., Trotman,W.E., Larmie,B., Habibovic,A., Peshavaria,M. & Leahy,J.L. (2005). Mechanisms of compensatory beta-cell growth in insulin-resistant rats: roles of Akt kinase. *Diabetes*, 54: 2294-2304.

Jiao,H., Berrada,K., Yang,W., Tabrizi,M., Platanias,L.C. & Yi,T. (1996). Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol.Cell Biol.*, 16: 6985-6992.

Jono,S., Ikari,Y., Shioi,A., Mori,K., Miki,T., Hara,K. & Nishizawa,Y. (2002). Serum osteoprotegerin levels are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation*, 106: 1192-1194.

Kahn,B.B. & Flier,J.S. (2000). Obesity and insulin resistance. *J.Clin.Invest*, 106: 473-481.

Kahn,S.E. (2003). The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia*, 46: 3-19.

Kahn,S.E. (2000). The importance of the beta-cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Am.J.Med.*, 108 Suppl 6a: 2S-8S.

Kahn,S.E. & Halban,P.A. (1997). Release of incompletely processed proinsulin is the cause of the disproportionate proinsulinemia of NIDDM. *Diabetes*, 46: 1725-1732.

Kahn,S.E., Zraika,S., Utzschneider,K.M. & Hull,R.L. (2009). The beta cell lesion in type 2 diabetes: there has to be a primary functional abnormality. *Diabetologia*, 52: 1003-1012.

Kaku,K., Province,M. & Permutt,M.A. (1989). Genetic analysis of obesity-induced diabetes associated with a limited capacity to synthesize insulin in C57BL/KS mice: evidence for polygenic control. *Diabetologia*, 32: 636-643.

Kanda,Y., Shimoda,M., Tawaramoto,K., Hamamoto,S., Tatsumi,F., Kawasaki,F., Hashiramoto,M., Nakashima,K., Matsuki,M. & Kaku,K. (2009). Molecular analysis of db gene-related pancreatic beta cell dysfunction; evidence for a compensatory mechanism inhibiting development of diabetes in the db gene heterozygote. *Endocr.J.*, 56: 997-1008.

Kaneto,H., Fujii,J., Myint,T., Miyazawa,N., Islam,K.N., Kawasaki,Y., Suzuki,K., Nakamura,M., Tatsumi,H., Yamasaki,Y. & Taniguchi,N. (1996). Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem.J.*, 320 (Pt 3): 855-863.

Kaneto,H., Kajimoto,Y., Miyagawa,J., Matsuoka,T., Fujitani,Y., Umayahara,Y., Hanafusa,T., Matsuzawa,Y., Yamasaki,Y. & Hori,M. (1999). Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes*, 48: 2398-2406.

Kaneto,H., Matsuoka,T.A., Nakatani,Y., Kawamori,D., Matsuhisa,M. & Yamasaki,Y. (2005). Oxidative stress and the JNK pathway in diabetes. *Curr.Diabetes Rev.*, 1: 65-72.

Kaprio, J., Tuomilehto, J., Koskenvuo, M., Romanov, K., Reunanen, A., Eriksson, J., Stengard, J. & Kesaniemi, Y.A. (1992). Concordance for type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. *Diabetologia*, 35: 1060-1067.

Karlsen, A.E., Heding, P.E., Frobose, H., Ronn, S.G., Kruhoffer, M., ORntoft, T.F., Darville, M., Eizirik, D.L., Pociot, F., Nerup, J., Mandrup-Poulsen, T. & Billestrup, N. (2004). Suppressor of cytokine signalling (SOCS)-3 protects beta cells against IL-1beta-mediated toxicity through inhibition of multiple nuclear factor-kappaB-regulated proapoptotic pathways. *Diabetologia*, 47: 1998-2011.

Karlsen, A.E., Ronn, S.G., Lindberg, K., Johannesen, J., Galsgaard, E.D., Pociot, F., Nielsen, J.H., Mandrup-Poulsen, T., Nerup, J. & Billestrup, N. (2001). Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) protects beta -cells against interleukin-1beta - and interferon-gamma -mediated toxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98: 12191-12196.

Kato,H., Nomura,K., Osabe,D., Shinohara,S., Mizumori,O., Katashima,R., Iwasaki,S., Nishimura,K., Yoshino,M., Kobori,M., Ichiishi,E., Nakamura,N., Yoshikawa,T., Tanahashi,T., Keshavarz,P., Kunika,K., Moritani,M., Kudo,E., Tsugawa,K., Takata,Y., Hamada,D., Yasui,N., Miyamoto,T., Shiota,H., Inoue,H. & Itakura,M. (2006). Association of single-nucleotide polymorphisms in the suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) gene with type 2 diabetes in the Japanese. *Genomics*, 87: 446-458.

Kerner,W., Brückel,J., Böhm,B.O. (2004). Evidenzbasierte Leitlinie der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) - Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus.

Khoo,S., Gibson,T.B., Arnette,D., Lawrence,M., January,B., McGlynn,K., Vanderbilt,C.A., Griffen,S.C., German,M.S. & Cobb,M.H. (2004). MAP kinases and their roles in pancreatic beta-cells. *Cell Biochem.Biophys.*, 40: 191-200.

Kile,B.T., Schulman,B.A., Alexander,W.S., Nicola,N.A., Martin,H.M. & Hilton,D.J. (2002). The SOCS box: a tale of destruction and degradation. *Trends Biochem.Sci.*, 27: 235-241.

Kim,C., Newton,K.M. & Knopp,R.H. (2002). Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care*, 25: 1862-1868.

Kjorholt, C., Akerfeldt, M.C., Biden, T.J. & Laybutt, D.R. (2005). Chronic hyperglycemia, independent of plasma lipid levels, is sufficient for the loss of beta-cell differentiation and secretory function in the db/db mouse model of diabetes. *Diabetes*, 54: 2755-2763.

Klöppel,G., Lohr,M., Habich,K., Oberholzer,M. & Heitz,P.U. (1985). Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited. *Surv.Synth.Pathol.Res.*, 4: 110-125.

Knip,M., Veijola,R., Virtanen,S.M., Hyoty,H., Vaarala,O. & Akerblom,H.K. (2005). Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes*, 54 Suppl 2: S125-S136.

Kong,Y.Y., Yoshida,H., Sarosi,I., Tan,H.L., Timms,E., Capparelli,C., Morony,S., Oliveira-dos-Santos,A.J., Van,G., Itie,A., Khoo,W., Wakeham,A., Dunstan,C.R., Lacey,D.L., Mak,T.W., Boyle,W.J. & Penninger,J.M. (1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397: 315-323.

Kostenuik, P.J. (2005). Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. *Curr.Opin.Pharmacol.*, 5: 618-625.

Krebs, D.L. & Hilton, D.J. (2001). SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells*, 19: 378-387.

Kurshakova,M.M., Kopytova,D.V., Nabirochkina,E.N., Nikolenko,I., Shidlovskii,I., Georgieva,S.G. & Krasnov,A.N. (2009). Conservative E(y)2/Sus1 protein is the member of SAGA complex and new nuclear pore-associated complex in Drosophila. *Genetika*, 45: 1332-1340.

Kushner, J.A., Simpson, L., Wartschow, L.M., Guo, S., Rankin, M.M., Parsons, R. & White, M.F. (2005). Phosphatase and tensin homolog regulation of islet growth and glucose homeostasis. *J.Biol.Chem.*, 280: 39388-39393.

Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y.X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J. & Boyle, W.J. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93: 165-176.

Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Lambert, C., Oury, C., Dejardin, E., Chariot, A., Piette, J., Malaise, M., Merville, M.P. & Franchimont, N. (2007). Further insights in the mechanisms of interleukin-1beta stimulation of osteoprotegerin in osteoblast-like cells. *J.Bone Miner.Res.*, 22: 1350-1361.

Larsen,L., Storling,J., Darville,M., Eizirik,D.L., Bonny,C., Billestrup,N. & Mandrup-Poulsen,T. (2005). Extracellular signal-regulated kinase is essential for interleukin-1induced and nuclear factor kappaB-mediated gene expression in insulin-producing INS-1E cells. *Diabetologia*, 48: 2582-2590.

Le,M.C., Chu,K., Hu,M., Ortega,C.S., Simpson,E.R., Korach,K.S., Tsai,M.J. & Mauvais-Jarvis,F. (2006). Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 103: 9232-9237.

Lee,G.H., Proenca,R., Montez,J.M., Carroll,K.M., Darvishzadeh,J.G., Lee,J.I. & Friedman,J.M. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, 379: 632-635.

Lee, S., Muniyappa, R., Yan, X., Chen, H., Yue, L.Q., Hong, E.G., Kim, J.K. & Quon, M.J. (2008). Comparison between surrogate indexes of insulin sensitivity and resistance and hyperinsulinemic euglycemic clamp estimates in mice. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, 294: E261-E270.

Lee,S.M. & Bressler,R. (1981). Prevention of diabetic nephropathy by diet control in the db/db mouse. *Diabetes*, 30: 106-111.

Lee, Y.C. & Nielsen, J.H. (2009). Regulation of beta cell replication. *Mol.Cell Endocrinol.*, 297: 18-27.

Leibiger,I.B., Leibiger,B. & Berggren,P.O. (2008). Insulin signaling in the pancreatic beta-cell. *Annu.Rev.Nutr.*, 28: 233-251.

Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51: 216-226.

Lenzen, S., Tiedge, M., Elsner, M., Lortz, S., Weiss, H., Jorns, A., Kloppel, G., Wedekind, D., Prokop, C.M. & Hedrich, H.J. (2001). The LEW.1AR1/Ztm-iddm rat: a new model of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia*, 44: 1189-1196.

Like, A.A. & Chick, W.L. (1970). Studies in the diabetic mutant mouse. I. Light microscopy and radioautography of pancreatic islets. *Diabetologia*, 6: 207-215.

Lindberg,K., Ronn,S.G., Tornehave,D., Richter,H., Hansen,J.A., Romer,J., Jackerott,M. & Billestrup,N. (2005). Regulation of pancreatic beta-cell mass and proliferation by SOCS-3. *J.Mol.Endocrinol.*, 35: 231-243.

Liu,B., Liao,J., Rao,X., Kushner,S.A., Chung,C.D., Chang,D.D. & Shuai,K. (1998). Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95: 10626-10631.

Liu,J.L., Coschigano,K.T., Robertson,K., Lipsett,M., Guo,Y., Kopchick,J.J., Kumar,U. & Liu,Y.L. (2004). Disruption of growth hormone receptor gene causes diminished pancreatic islet size and increased insulin sensitivity in mice. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, 287: E405-E413.

Lorenzo, A., Razzaboni, B., Weir, G.C. & Yankner, B.A. (1994). Pancreatic islet cell toxicity of amylin associated with type-2 diabetes mellitus. *Nature*, 368: 756-760.

Macfarlane, M. (2003). TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicol.Lett.*, 139: 89-97.

Maedler,K., Sergeev,P., Ris,F., Oberholzer,J., Joller-Jemelka,H.I., Spinas,G.A., Kaiser,N., Halban,P.A. & Donath,M.Y. (2002). Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J.Clin.Invest*, 110: 851-860.

Maedler,K., Spinas,G.A., Lehmann,R., Sergeev,P., Weber,M., Fontana,A., Kaiser,N. & Donath,M.Y. (2001). Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes*, 50: 1683-1690.

Maine, G.N. & Burstein, E. (2007). COMMD proteins: COMMing to the scene. *Cell Mol.Life Sci.*, 64: 1997-2005.

Makeeva, N., Myers, J.W. & Welsh, N. (2006). Role of MKK3 and p38 MAPK in cytokine-induced death of insulin-producing cells. *Biochem.J.*, 393: 129-139.

Mancino,A.T., Klimberg,V.S., Yamamoto,M., Manolagas,S.C. & Abe,E. (2001). Breast cancer increases osteoclastogenesis by secreting M-CSF and upregulating RANKL in stromal cells. *J.Surg.Res.*, 100: 18-24.

Marchetti,P., Bugliani,M., Lupi,R., Marselli,L., Masini,M., Boggi,U., Filipponi,F., Weir,G.C., Eizirik,D.L. & Cnop,M. (2007). The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients. *Diabetologia*, 50: 2486-2494.

Marine, J.C., McKay, C., Wang, D., Topham, D.J., Parganas, E., Nakajima, H., Pendeville, H., Yasukawa, H., Sasaki, A., Yoshimura, A. & Ihle, J.N. (1999a). SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis. *Cell*, 98: 617-627.

Marine, J.C., Topham, D.J., McKay, C., Wang, D., Parganas, E., Stravopodis, D., Yoshimura, A. & Ihle, J.N. (1999b). SOCS1 deficiency causes a lymphocytedependent perinatal lethality. *Cell*, 98: 609-616.

Matschinsky, F.M. (1996). Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes*, 45: 223-241.

Matsuda, T., Kido, Y., Uchida, T. & Kasuga, M. (2008). Reduced insulin signaling and endoplasmic reticulum stress act synergistically to deteriorate pancreatic beta cell function. *Kobe J.Med.Sci.*, 54: E114-E121.

Matsumoto,A., Masuhara,M., Mitsui,K., Yokouchi,M., Ohtsubo,M., Misawa,H., Miyajima,A. & Yoshimura,A. (1997). CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood*, 89: 3148-3154.

Mauricio, D. & Mandrup-Poulsen, T. (1998). Apoptosis and the pathogenesis of IDDM: a question of life and death. *Diabetes*, 47: 1537-1543.

Merglen, A., Theander, S., Rubi, B., Chaffard, G., Wollheim, C.B. & Maechler, P. (2004). Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells. *Endocrinology*, 145: 667-678.

Metcalf, D., Greenhalgh, C.J., Viney, E., Willson, T.A., Starr, R., Nicola, N.A., Hilton, D.J. & Alexander, W.S. (2000). Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature*, 405: 1069-1073.

Miranda, P.J., DeFronzo, R.A., Califf, R.M. & Guyton, J.R. (2005). Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *Am.Heart J.*, 149: 33-45.

Mitchell, P. & Moyle, J. (1967). Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature*, 213: 137-139.

Miyazaki, J., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y. & Yamamura, K. (1990). Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology*, 127: 126-132.

Mooney,R.A., Senn,J., Cameron,S., Inamdar,N., Boivin,L.M., Shang,Y. & Furlanetto,R.W. (2001). Suppressors of cytokine signaling-1 and -6 associate with and inhibit the insulin receptor. A potential mechanism for cytokine-mediated insulin resistance. *J.Biol.Chem.*, 276: 25889-25893.

Mosheimer, B.A., Kaneider, N.C., Feistritzer, C., Djanani, A.M., Sturn, D.H., Patsch, J.R. & Wiedermann, C.J. (2005). Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 90: 2964-2971.

Mosmann,T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J.Immunol.Methods*, 65: 55-63.

Nabipour,I., Kalantarhormozi,M., Larijani,B., Assadi,M. & Sanjdideh,Z. (2010). Osteoprotegerin in relation to type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Metabolism*, 59: 742-747.

Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S. & Kishimoto, T. (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 387: 924-929.

Nakata,M., Okada,T., Ozawa,K. & Yada,T. (2007). Resistin induces insulin resistance in pancreatic islets to impair glucose-induced insulin release. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 353: 1046-1051.

Nakhooda,A.F., Like,A.A., Chappel,C.I., Murray,F.T. & Marliss,E.B. (1977). The spontaneously diabetic Wistar rat. Metabolic and morphologic studies. *Diabetes*, 26: 100-112.

Newgard, C.B. & McGarry, J.D. (1995). Metabolic coupling factors in pancreatic betacell signal transduction. *Annu.Rev.Biochem.*, 64: 689-719.

Nielsen, J.H., Svensson, C., Galsgaard, E.D., Moldrup, A. & Billestrup, N. (1999). Beta cell proliferation and growth factors. *J.Mol.Med.*, 77: 62-66.

O'Brien, B.A., Harmon, B.V., Cameron, D.P. & Allan, D.J. (1996). Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *J.Pathol.*, 178: 176-181.

O'Meara,N.M., Sturis,J., Van,C.E. & Polonsky,K.S. (1993). Lack of control by glucose of ultradian insulin secretory oscillations in impaired glucose tolerance and in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J.Clin.Invest*, 92: 262-271.

Odugbesan,O., Rowe,B., Fletcher,J., Walford,S. & Barnett,A.H. (1989). Diabetes in the UK West indian community: the Wolverhampton survey. *Diabet.Med.*, 6: 48-52.

Ounissi-Benkalha,H. & Polychronakos,C. (2008). The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanisms. *Trends Mol.Med.*, 14: 268-275.

Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L.H. & Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, 306: 457-461.

Paik,S.G., Michelis,M.A., Kim,Y.T. & Shin,S. (1982). Induction of insulin-dependent diabetes by streptozotocin. Inhibition by estrogens and potentiation by androgens. *Diabetes*, 31: 724-729.

Pan,X.R., Li,G.W., Hu,Y.H., Wang,J.X., Yang,W.Y., An,Z.X., Hu,Z.X., Lin,J., Xiao,J.Z., Cao,H.B., Liu,P.A., Jiang,X.G., Jiang,Y.Y., Wang,J.P., Zheng,H., Zhang,H., Bennett,P.H. & Howard,B.V. (1997). Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care*, 20: 537-544.

Pantouli,E., Boehm,M.M. & Koka,S. (2005). Inflammatory cytokines activate p38 MAPK to induce osteoprotegerin synthesis by MG-63 cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 329: 224-229.

Parsons, J.A., Bartke, A. & Sorenson, R.L. (1995). Number and size of islets of Langerhans in pregnant, human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: effect of lactogenic hormones. *Endocrinology*, 136: 2013-2021.

Parsons, J.A., Brelje, T.C. & Sorenson, R.L. (1992). Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology*, 130: 1459-1466.

Pavlovic, D., Andersen, N.A., Mandrup-Poulsen, T. & Eizirik, D.L. (2000). Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 contributes to cytokine-induced apoptosis in purified rat pancreatic beta-cells. *Eur.Cytokine Netw.*, 11: 267-274.

Pearl-Yafe, M., Kaminitz, A., Yolcu, E.S., Yaniv, I., Stein, J. & Askenasy, N. (2007). Pancreatic islets under attack: cellular and molecular effectors. *Curr.Pharm.Des*, 13: 749-760.

Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T. & Collins, F. (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 269: 540-543.

Peppa,M. & Vlassara,H. (2005). Advanced glycation end products and diabetic complications: a general overview. *Hormones.(Athens.)*, 4: 28-37.

Pezet, A., Favre, H., Kelly, P.A. & Edery, M. (1999). Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. *J.Biol.Chem.*, 274: 24497-24502.

Pick,A., Clark,J., Kubstrup,C., Levisetti,M., Pugh,W., Bonner-Weir,S. & Polonsky,K.S. (1998). Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat. *Diabetes*, 47: 358-364.

Piessevaux, J., Lavens, D., Montoye, T., Wauman, J., Catteeuw, D., Vandekerckhove, J., Belsham, D., Peelman, F. & Tavernier, J. (2006). Functional cross-modulation between SOCS proteins can stimulate cytokine signaling. *J.Biol.Chem.*, 281: 32953-32966.

Pilkis, S.J. & Granner, D.K. (1992). Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu.Rev.Physiol*, 54: 885-909.

Pirot, P., Cardozo, A.K. & Eizirik, D.L. (2008). Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. *Arq Bras.Endocrinol.Metabol.*, 52: 156-165.

Poitout, V. & Robertson, R.P. (2008). Glucolipotoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr. Rev.*, 29: 351-366.

Polonsky,K.S. (2000). Dynamics of insulin secretion in obesity and diabetes. *Int.J.Obes.Relat Metab Disord.*, 24 Suppl 2: S29-S31.

Porksen, N. (2002). The in vivo regulation of pulsatile insulin secretion. *Diabetologia*, 45: 3-20.

Prentki,M. & Nolan,C.J. (2006). Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J.Clin.Invest*, 116: 1802-1812.

Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R.M., Sempoux, C. & Henquin, J.C. (2008). Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes.Metab*, 10 Suppl 4: 32-42.

Rakesh,K. & Agrawal,D.K. (2005). Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors. *Biochem.Pharmacol.*, 70: 649-657.

Ram, P.A. & Waxman, D.J. (1999). SOCS/CIS protein inhibition of growth hormonestimulated STAT5 signaling by multiple mechanisms. *J.Biol.Chem.*, 274: 35553-35561.

Rankin, M.M. & Kushner, J.A. (2009). Adaptive beta-cell proliferation is severely restricted with advanced age. *Diabetes*, 58: 1365-1372.

Rasche, A., Al-Hasani, H. & Herwig, R. (2008). Meta-analysis approach identifies candidate genes and associated molecular networks for type-2 diabetes mellitus. *BMC.Genomics*, 9: 310.

Rasmussen, L.M., Tarnow, L., Hansen, T.K., Parving, H.H. & Flyvbjerg, A. (2006). Plasma osteoprotegerin levels are associated with glycaemic status, systolic blood pressure, kidney function and cardiovascular morbidity in type 1 diabetic patients. *Eur.J.Endocrinol.*, 154: 75-81.

Rawlings, J.S., Rosler, K.M. & Harrison, D.A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *J.Cell Sci.*, 117: 1281-1283.

Rees, D.A. & Alcolado, J.C. (2005). Animal models of diabetes mellitus. *Diabet.Med.*, 22: 359-370.

Reimann, M., Bonifacio, E., Solimena, M., Schwarz, P.E., Ludwig, B., Hanefeld, M. & Bornstein, S.R. (2009). An update on preventive and regenerative therapies in diabetes mellitus. *Pharmacol.Ther.*, 121: 317-331.

Rico-Bautista, E., Flores-Morales, A. & Fernandez-Perez, L. (2006). Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 2, a protein with multiple functions. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 17: 431-439.

Rico-Bautista, E., Greenhalgh, C.J., Tollet-Egnell, P., Hilton, D.J., Alexander, W.S., Norstedt, G. & Flores-Morales, A. (2005). Suppressor of cytokine signaling-2 deficiency induces molecular and metabolic changes that partially overlap with growth hormone-dependent effects. *Mol. Endocrinol.*, 19: 781-793.

Rieck, S. & Kaestner, K.H. (2010). Expansion of beta-cell mass in response to pregnancy. *Trends Endocrinol.Metab*, 21: 151-158.

Rieck, S., White, P., Schug, J., Fox, A.J., Smirnova, O., Gao, N., Gupta, R.K., Wang, Z.V., Scherer, P.E., Keller, M.P., Attie, A.D. & Kaestner, K.H. (2009). The transcriptional response of the islet to pregnancy in mice. *Mol.Endocrinol.*, 23: 1702-1712.

Ronn,S.G., Hansen,J.A., Lindberg,K., Karlsen,A.E. & Billestrup,N. (2002). The effect of suppressor of cytokine signaling 3 on GH signaling in beta-cells. *Mol.Endocrinol.*, 16: 2124-2134.

Rorsman, P. & Renstrom, E. (2003). Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 46: 1029-1045.

Rui,L., Yuan,M., Frantz,D., Shoelson,S. & White,M.F. (2002). SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J.Biol.Chem.*, 277: 42394-42398.

Saito,H., Morita,Y., Fujimoto,M., Narazaki,M., Naka,T. & Kishimoto,T. (2000). IFN regulatory factor-1-mediated transcriptional activation of mouse STAT-induced STAT inhibitor-1 gene promoter by IFN-gamma. *J.Immunol.*, 164: 5833-5843.

Sakai,K., Matsumoto,K., Nishikawa,T., Suefuji,M., Nakamaru,K., Hirashima,Y., Kawashima,J., Shirotani,T., Ichinose,K., Brownlee,M. & Araki,E. (2003). Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 300: 216-222.

Saldeen, J., Lee, J.C. & Welsh, N. (2001). Role of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in cytokine-induced rat islet cell apoptosis. *Biochem.Pharmacol.*, 61: 1561-1569.

Salminen,K., Sadeharju,K., Lonnrot,M., Vahasalo,P., Kupila,A., Korhonen,S., Ilonen,J., Simell,O., Knip,M. & Hyoty,H. (2003). Enterovirus infections are associated with the induction of beta-cell autoimmunity in a prospective birth cohort study. *J.Med.Virol.*, 69: 91-98.

Saltiel,A.R. (2000). Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases. *J.Clin.Invest*, 106: 163-164.

Saltiel,A.R. & Kahn,C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414: 799-806.
Santangelo, C., Scipioni, A., Marselli, L., Marchetti, P. & Dotta, F. (2005). Suppressor of cytokine signaling gene expression in human pancreatic islets: modulation by cytokines. *Eur.J.Endocrinol.*, 152: 485-489.

Sasaki,A., Yasukawa,H., Suzuki,A., Kamizono,S., Syoda,T., Kinjyo,I., Sasaki,M., Johnston,J.A. & Yoshimura,A. (1999). Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells*, 4: 339-351.

Satoh,K., Kaneko,K., Hirota,M., Masamune,A., Satoh,A. & Shimosegawa,T. (2001). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and its receptor expression and the pathway of apoptosis in human pancreatic cancer. *Pancreas*, 23: 251-258.

Saudek, C.D., Finkowski, M. & Knopp, R.H. (1975). Plasma Glucagon and Insulin in Rat Pregnancy - Roles in Glucose Homesostasis. *J.Clin.Invest*, 55: 180-187.

Scaglia,L., Smith,F.E. & Bonner-Weir,S. (1995). Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology*, 136: 5461-5468.

Schrader, J., Rennekamp, W., Niebergall, U., Schoppet, M., Jahr, H., Brendel, M.D., Horsch, D. & Hofbauer, L.C. (2007). Cytokine-induced osteoprotegerin expression protects pancreatic beta cells through p38 mitogen-activated protein kinase signalling against cell death. *Diabetologia*, 50: 1243-1247.

Secchiero, P., Corallini, F., Pandolfi, A., Consoli, A., Candido, R., Fabris, B., Celeghini, C., Capitani, S. & Zauli, G. (2006). An increased osteoprotegerin serum release characterizes the early onset of diabetes mellitus and may contribute to endothelial cell dysfunction. *Am.J.Pathol.*, 169: 2236-2244.

Seufert, J., Kieffer, T.J. & Habener, J.F. (1999). Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96: 674-679.

Shin,C.S., Moon,B.S., Park,K.S., Kim,S.Y., Park,S.J., Chung,M.H. & Lee,H.K. (2001). Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients. *Diabetes Care*, 24: 733-737.

Simonet,W.S., Lacey,D.L., Dunstan,C.R., Kelley,M., Chang,M.S., Luthy,R., Nguyen,H.Q., Wooden,S., Bennett,L., Boone,T., Shimamoto,G., DeRose,M., Elliott,R., Colombero,A., Tan,H.L., Trail,G., Sullivan,J., Davy,E., Bucay,N., Renshaw-Gegg,L., Hughes,T.M., Hill,D., Pattison,W., Campbell,P., Sander,S., Van,G., Tarpley,J., Derby,P., Lee,R. & Boyle,W.J. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89: 309-319.

Sladek,R., Rocheleau,G., Rung,J., Dina,C., Shen,L., Serre,D., Boutin,P., Vincent,D., Belisle,A., Hadjadj,S., Balkau,B., Heude,B., Charpentier,G., Hudson,T.J., Montpetit,A., Pshezhetsky,A.V., Prentki,M., Posner,B.I., Balding,D.J., Meyre,D., Polychronakos,C. & Froguel,P. (2007). A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*, 445: 881-885.

Sorenson, R.L. & Brelje, T.C. (1997). Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: beta-cell growth, enhanced insulin secretion and the role of lactogenic hormones. *Horm.Metab Res.*, 29: 301-307.

Spranger, J., Kroke, A., Mohlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M.M., Ristow, M., Boeing, H. & Pfeiffer, A.F. (2003). Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes*, 52: 812-817.

Standal,T., Seidel,C., Hjertner,O., Plesner,T., Sanderson,R.D., Waage,A., Borset,M. & Sundan,A. (2002). Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood*, 100: 3002-3007.

Starr,R., Metcalf,D., Elefanty,A.G., Brysha,M., Willson,T.A., Nicola,N.A., Hilton,D.J. & Alexander,W.S. (1998). Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95: 14395-14399.

Starr,R., Willson,T.A., Viney,E.M., Murray,L.J., Rayner,J.R., Jenkins,B.J., Gonda,T.J., Alexander,W.S., Metcalf,D., Nicola,N.A. & Hilton,D.J. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 387: 917-921.

Steen,H. & Lindholm,D. (2008). Nuclear localized protein-1 (Nulp1) increases cell death of human osteosarcoma cells and binds the X-linked inhibitor of apoptosis protein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 366: 432-437.

Steil,G.M., Trivedi,N., Jonas,J.C., Hasenkamp,W.M., Sharma,A., Bonner-Weir,S. & Weir,G.C. (2001). Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, 280: E788-E796.

Steiner, D.F., Cunningham, D., Spigelman, L. & Aten, B. (1967). Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science*, 157: 697-700.

Steiner, D.F., Kim, A., Miller, K. & Hara, M. (2010). Pancreatic islet plasticity-Interspecies comparison of islet architecture and composition. Islets, 2:3, 1-11.

Suchindran, S., Vana, A.M., Shaffer, R.A., Alcaraz, J.E. & McCarthy, J.J. (2009). Racial differences in the interaction between family history and risk factors associated with diabetes in the National Health and Nutritional Examination Survey, 1999-2004. *Genet.Med.*, 11: 542-547.

Surampudi, P.N., John-Kalarickal, J. & Fonseca, V.A. (2009). Emerging concepts in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Mt.Sinai J.Med.*, 76: 216-226.

Suzuki,K., Kurose,T., Takizawa,M., Maruyama,M., Ushikawa,K., Kikuyama,M., Sugimoto,C., Seino,Y., Nagamatsu,S. & Ishida,H. (2005). Osteoclastic function is accelerated in male patients with type 2 diabetes mellitus: the preventive role of osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin (OCIF/OPG) on the decrease of bone mineral density. *Diabetes Res.Clin.Pract.*, 68: 117-125.

Takaya,K., Ogawa,Y., Isse,N., Okazaki,T., Satoh,N., Masuzaki,H., Mori,K., Tamura,N., Hosoda,K. & Nakao,K. (1996). Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs - identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 225: 75-83.

Tannahill,G.M., Elliott,J., Barry,A.C., Hibbert,L., Cacalano,N.A. & Johnston,J.A. (2005). SOCS2 can enhance interleukin-2 (IL-2) and IL-3 signaling by accelerating SOCS3 degradation. *Mol.Cell Biol.*, 25: 9115-9126.

Tartaglia,L.A., Dembski,M., Weng,X., Deng,N., Culpepper,J., Devos,R., Richards,G.J., Campfield,L.A., Clark,F.T., Deeds,J., Muir,C., Sanker,S., Moriarty,A., Moore,K.J., Smutko,J.S., Mays,G.G., Wool,E.A., Monroe,C.A. & Tepper,R.I. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 83: 1263-1271.

Theoleyre,S., Kwan,T.S., Vusio,P., Blanchard,F., Gallagher,J., Ricard-Blum,S., Fortun,Y., Padrines,M., Redini,F. & Heymann,D. (2006). Characterization of osteoprotegerin binding to glycosaminoglycans by surface plasmon resonance: role in the interactions with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and RANK. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 347: 460-467.

Thomas, H.E. & Kay, T.W. (2000). Beta cell destruction in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes Metab Res.Rev.*, 16: 251-261.

Tiedge,M., Lortz,S., Drinkgern,J. & Lenzen,S. (1997). Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*, 46: 1733-1742.

Tilg,H. & Moschen,A.R. (2008). Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol.Med.*, 14: 222-231.

Topp,B.G., Atkinson,L.L. & Finegood,D.T. (2007). Dynamics of insulin sensitivity,  $\beta$ -cell function, and  $\beta$ -cell mass during the development of diabetes in fa/fa rats. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, 293: E1730-E1735.

Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T. & Higashio, K. (1997). Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 234: 137-142.

Uchida,T., Nakamura,T., Hashimoto,N., Matsuda,T., Kotani,K., Sakaue,H., Kido,Y., Hayashi,Y., Nakayama,K.I., White,M.F. & Kasuga,M. (2005). Deletion of Cdkn1b ameliorates hyperglycemia by maintaining compensatory hyperinsulinemia in diabetic mice. *Nat.Med.*, 11: 175-182.

Udagawa,N., Takahashi,N., Yasuda,H., Mizuno,A., Itoh,K., Ueno,Y., Shinki,T., Gillespie,M.T., Martin,T.J., Higashio,K. & Suda,T. (2000). Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*, 141: 3478-3484.

Ueki,K., Kondo,T. & Kahn,C.R. (2004). Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol.Cell Biol.*, 24: 5434-5446.

Van Assche, F.A., Aerts, L. & de, P.F. (1978). A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy. *Br.J.Obstet.Gynaecol.*, 85: 818-820.

Vidal,O.M., Merino,R., Rico-Bautista,E., Fernandez-Perez,L., Chia,D.J., Woelfle,J., Ono,M., Lenhard,B., Norstedt,G., Rotwein,P. & Flores-Morales,A. (2007). In vivo transcript profiling and phylogenetic analysis identifies suppressor of cytokine signaling 2 as a direct signal transducer and activator of transcription 5b target in liver. *Mol.Endocrinol.*, 21: 293-311.

Wang,Q. & Brubaker,P.L. (2002). Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice. *Diabetologia*, 45: 1263-1273.

Wellen,K.E. & Hotamisligil,G.S. (2005). Inflammation, stress, and diabetes. *J.Clin.Invest*, 115: 1111-1119.

Weyer, C., Bogardus, C., Mott, D.M. & Pratley, R.E. (1999). The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J.Clin.Invest*, 104: 787-794.

Wierup, N., Svensson, H., Mulder, H. & Sundler, F. (2002). The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul.Pept.*, 107: 63-69.

Wong,B.R., Josien,R. & Choi,Y. (1999). TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *J.Leukoc.Biol.*, 65: 715-724.

Yamaguchi,K., Kinosaki,M., Goto,M., Kobayashi,F., Tsuda,E., Morinaga,T. & Higashio,K. (1998). Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J.Biol.Chem.*, 273: 5117-5123.

Yamauchi,T., Kamon,J., Waki,H., Terauchi,Y., Kubota,N., Hara,K., Mori,Y., Ide,T., Murakami,K., Tsuboyama-Kasaoka,N., Ezaki,O., Akanuma,Y., Gavrilova,O., Vinson,C., Reitman,M.L., Kagechika,H., Shudo,K., Yoda,M., Nakano,Y., Tobe,K., Nagai,R., Kimura,S., Tomita,M., Froguel,P. & Kadowaki,T. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat.Med.*, 7: 941-946.

Yasukawa,H., Misawa,H., Sakamoto,H., Masuhara,M., Sasaki,A., Wakioka,T., Ohtsuka,S., Imaizumi,T., Matsuda,T., Ihle,J.N. & Yoshimura,A. (1999). The JAKbinding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J.*, 18: 1309-1320.

Yasukawa,H., Ohishi,M., Mori,H., Murakami,M., Chinen,T., Aki,D., Hanada,T., Takeda,K., Akira,S., Hoshijima,M., Hirano,T., Chien,K.R. & Yoshimura,A. (2003). IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat.Immunol.*, 4: 551-556.

Yoon,K.H., Ko,S.H., Cho,J.H., Lee,J.M., Ahn,Y.B., Song,K.H., Yoo,S.J., Kang,M.I., Cha,B.Y., Lee,K.W., Son,H.Y., Kang,S.K., Kim,H.S., Lee,I.K. & Bonner-Weir,S. (2003). Selective beta-cell loss and alpha-cell expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 88: 2300-2308.

Yoshimura,A., Ohkubo,T., Kiguchi,T., Jenkins,N.A., Gilbert,D.J., Copeland,N.G., Hara,T. & Miyajima,A. (1995). A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J.*, 14: 2816-2826.

Zauli,G., Melloni,E., Capitani,S. & Secchiero,P. (2009). Role of full-length osteoprotegerin in tumor cell biology. *Cell Mol.Life Sci.*, 66: 841-851.

Zeggini,E., Weedon,M.N., Lindgren,C.M., Frayling,T.M., Elliott,K.S., Lango,H., Timpson,N.J., Perry,J.R., Rayner,N.W., Freathy,R.M., Barrett,J.C., Shields,B., Morris,A.P., Ellard,S., Groves,C.J., Harries,L.W., Marchini,J.L., Owen,K.R., Knight,B., Cardon,L.R., Walker,M., Hitman,G.A., Morris,A.D., Doney,A.S., McCarthy,M.I. & Hattersley,A.T. (2007). Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science*, 316: 1336-1341.

Zhao,Y., Lang,G., Ito,S., Bonnet,J., Metzger,E., Sawatsubashi,S., Suzuki,E., Le,G., X, Stunnenberg,H.G., Krasnov,A., Georgieva,S.G., Schule,R., Takeyama,K., Kato,S., Tora,L. & Devys,D. (2008). A TFTC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. *Mol.Cell*, 29: 92-101.

Ziegler,A.G., Hummel,M., Schenker,M. & Bonifacio,E. (1999). Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. *Diabetes*, 48: 460-468.

Zimmet, P., Alberti, K.G. & Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414: 782-787.

Zimmet, P.Z., Tuomi, T., Mackay, I.R., Rowley, M.J., Knowles, W., Cohen, M. & Lang, D.A. (1994). Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabet.Med.*, 11: 299-303.

Ziolkowska,M., Kurowska,M., Radzikowska,A., Luszczykiewicz,G., Wiland,P., Dziewczopolski,W., Filipowicz-Sosnowska,A., Pazdur,J., Szechinski,J., Kowalczewski,J., Rell-Bakalarska,M. & Maslinski,W. (2002). High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor alpha treatment. *Arthritis Rheum.*, 46: 1744-1753.

Zong,C.S., Chan,J., Levy,D.E., Horvath,C., Sadowski,H.B. & Wang,L.H. (2000). Mechanism of STAT3 activation by insulin-like growth factor I receptor. *J.Biol.Chem.*, 275: 15099-15105.

### Publikationen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Petra Dames, **Ramona Puff**, Michaela Weise, Klaus G. Parhofer, Burkhard Göke, Magdalena Götz, Jochen Graw, Jack Favor, Andreas Lechner (2010). Relative roles of the different Pax6 domains for pancreatic alpha cell development. BMC Developmental Biology 2010, 10:39

**R. Puff**, P. Dames, M. Weise, B. Göke, J. Seißler, K. G. Parhofer, A. Lechner (2010). Declining proliferation and a high apoptotic frequency of pancreatic beta cells contribute to genetically-determined diabetes susceptibility of db/db BKS mice. (submitted).

**Ramona Puff**, Petra Dames, Michaela Weise, Burkhard Göke, W. S. Alexander, Klaus G. Parhofer, and Andreas Lechner (2010). No non-redundant function of Suppressor of Cytokine Signaling 2 in insulin producing beta cells. Islets 2010, 2:4.

#### Posterpräsentation:

**R. Puff**, P. Dames, M. Weise, B. Göke, K. G. Parhofer, A. Lechner (2010). Mechanisms of genetically-determined diabetes resistance and susceptibility in db/db mice. 45. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) in Stuttgart.

## Danksagung

Es gibt viele Menschen, die auf ihre Weise ihren Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben. Diesen möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich danken, auch wenn sie hier teilweise nicht namentlich erwähnt werden.

Herrn Prof. Dr. Burkhard Göke danke ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion in der Medizinischen Klinik II in München/Großhadern.

Bei Frau Prof. Dr. Angelika Böttger möchte ich mich recht herzlich für die unkomplizierte Vertretung meiner Dissertation an der Fakultät für Biologie an der Ludwig-Maximillians-Universität München bedanken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Betreuer Dr. Andreas Lechner, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit entstand, für die Überlassung des interessanten Themas, seine vielfältigen Ideen und Ratschläge sowie die freundliche und wissenschaftliche Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich allen Kollegen und Kolleginnen der Arbeitsgruppen Auernhammer, Brödl, Herbst, Kolligs, Lechner, Lehrke, Parhofer und Spitzweg für die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit. Diesbezüglich bedanke ich mich insbesondere bei Michaela Weise für Ihre Hilfe bei der Zellkultur, im Tierstall sowie der Anfertigung von Gewebeschnitten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mich in all den Jahren in jeder möglichen Form unterstützt und motiviert haben.

### Lebenslauf

#### Persönliche Daten

Name:	Ramona Michaela Puff
Geburtsdatum:	14. Oktober 1981
Geburtsort:	Coburg
Familienstand:	ledig

#### **Schulausbildung**

1988 - 1992	Volksschule Weidhausen
1992 - 1995	Kaspar-Zeuß-Gymnasium Kronach
1995 - 2001	Frankenwald-Gymnasium Kronach
2001	Abitur

#### Hochschulausbildung

Okt. 2001 - Sept. 2006	Studium an der Fakultät für Biologie, Chemie und Geo-
	wissenschaften der Universität Bayreuth
	Spezialisierung: Molekular- und Zellbiologie
	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Genetik;
	Thema: "Reinigung sekretierter Proteine in Bacillus subtilis
	durch ein Ein-Schritt-Verfahren".

### **Promotion**

Sept. 2006 – Sept. 2010 Naturwissenschaftliche Promotion am Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München/Großhadern; Thema: "Neue zelluläre und molekulare Aspekte der Betazelldysfunktion beim Typ-2-Diabetes mellitus".

# Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation "Neue zelluläre and molekulare Aspekte der  $\beta$ -Zelldysfunktion beim Typ-2-Diabetes mellitus" eigenständig angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht.

München, Juli 2010

Ramona Puff