

Aus dem  
Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Analyse des durch Glukose organisierten  
Genexpressionsnetzwerks in NPYR-/MC4R-positiven,  
hypothalamischen Neuronen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Leonhard Maximilian Webert

aus  
Lippstadt

Jahr  
2025

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Erstes Gutachten: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Zweites Gutachten: Prof. Dr. Jochen Seißler

Drittes Gutachten: Prof. Dr. Ludwig Schaaf

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2025



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät  
Promotionsbüro



## Eidesstattliche Versicherung

Webert, Leonhard Maximilian

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Analyse des durch Glukose organisierten Genexpressionsnetzwerks in  
NPYR-/MC4R-positiven,  
hypothalamischen Neuronen**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 28.08.2025

Ort, Datum

Leonhard Webert

Unterschrift Leonhard Maximilian Webert



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät  
Promotionsbüro



## Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung

Webert, Leonhard Maximilian

Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

**Analyse des durch Glukose organisierten Genexpressionsnetzwerks in NPYR-/MC4R-positiven,  
hypothalamischen Neuronen**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

München, 28.08.2025

Ort, Datum

Leonhard Webert

Unterschrift Leonhard Maximilian Webert

**Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:**

Webert, L., Faro, D., Zeitlmayr, S., Gudermann, T., & Breit, A. 2022. Analysis of the Glucose-Dependent Transcriptome in Murine Hypothalamic Cells. *Cells*, 11(4).



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>xv</b>
<b>Summary</b>	<b>xvii</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Glukosestoffwechsel und Blutglukosespiegel . . . . .	2
1.1.1 Inselzell-zentriertes Regulationsmodell des Glukosestoffwechsels . .	3
1.1.2 Gehirn-zentriertes Regulationsmodell des Glukosestoffwechsels . . .	6
1.2 Pathologie des Glukosestoffwechsels . . . . .	7
1.2.1 Bedeutung eines pathologisch veränderten Glukosestoffwechsels in ausgewählten Krankheitsbildern . . . . .	7
1.2.2 Rolle des Gehirns bei der Entwicklung einer pathologisch veränderten Glukosehomöostase . . . . .	8
1.2.3 Genetische Einflüsse auf die Genese verschiedener Erkrankungen mit pathologisch verändertem Glukosestoffwechsel . . . . .	10
1.2.4 Glukose-intrinsische Eigenschaften und deren Rolle bei der Heraus- bildung von Stoffwechselerkrankungen . . . . .	11
1.3 Zell- und molekularbiologische Mechanismen . . . . .	11
1.4 Glukosekonzentrationen im Gehirn . . . . .	12
1.5 Zielsetzung und Abgrenzung von Vor- und Vergleichsarbeiten . . . . .	12
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1 Material . . . . .	15
2.1.1 Zellen . . . . .	15
2.1.2 Nährmedien . . . . .	16
2.1.3 Geräte . . . . .	16
2.1.4 Verbrauchsmaterialien . . . . .	18
2.1.5 Chemikalien . . . . .	19
2.1.6 Radioaktive Moleküle . . . . .	20
2.1.7 Antikörper . . . . .	21
2.1.8 Primer . . . . .	21
2.2 Methoden . . . . .	26
2.2.1 Zellkultivierung . . . . .	26

2.2.2	RNA-Sequenzierung . . . . .	26
2.2.3	RT-qPCR . . . . .	27
2.2.4	Western-Blot . . . . .	29
2.2.5	Bestimmung der RHO-Aktivität . . . . .	32
2.2.6	Messung der cAMP-Akkumulation . . . . .	33
2.2.7	Statistische Methoden . . . . .	35
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
3.1	Bestimmung der Stimulationszeit . . . . .	37
3.2	RNA-Sequenzierung: Differenzierte Beeinflussung des Transkriptoms durch Glukose . . . . .	37
3.2.1	Qualitätskontrolle . . . . .	37
3.2.2	Analyse der RNA-Sequenzierung . . . . .	49
3.3	RT-qPCR: Validierung der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung . . . . .	53
3.3.1	Normierung, Referenz- und Haushaltsgene . . . . .	55
3.3.2	Allgemeiner Überblick . . . . .	55
3.3.3	Insulin- und IGF-Signalweg . . . . .	57
3.3.4	Insulin-induziertes Gen 1 und 2 (INSIG1/2) . . . . .	58
3.3.5	RAS-GTPasen . . . . .	61
3.3.6	RAF-Kinasen . . . . .	62
3.3.7	MEK und ERK . . . . .	64
3.3.8	Serum Response Element (SRE) . . . . .	64
3.3.9	cAMP Response Element (CRE) . . . . .	66
3.3.10	STAT-Signalweg . . . . .	70
3.3.11	SOCS-Familie ( <i>Suppressor of Cytokine Signalling</i> ) . . . . .	73
3.3.12	RAB-Familie . . . . .	74
3.3.13	TBC1D-Familie . . . . .	79
3.3.14	RAP und RAP-GEFs . . . . .	83
3.3.15	RHO und RHO-GEFs . . . . .	85
3.3.16	Heterotrimere G-Proteine . . . . .	90
3.3.17	Adenylatzyklasen . . . . .	93
3.3.18	Glukosetransporter . . . . .	93
3.3.19	Sirtuine . . . . .	95
3.3.20	LEPROT und LEPROTL1 . . . . .	99
3.3.21	S100A10 . . . . .	101
3.3.22	Gene, deren Expression durch Glukose hochsignifikant beeinflusst wurde . . . . .	103
3.4	RT-qPCR: Dosis-Wirkungs-Verhältnis auf RNA-Ebene . . . . .	103
3.5	Proteinnachweis: Überprüfung der Genexpression auf Proteinebene . . . . .	107
3.5.1	Einfluss der Glukose auf die IGF-1-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2, AKT und CREB . . . . .	107
3.6	Effekte von Glukose auf das monomere G-Protein RHO . . . . .	108
3.7	Glukose erhöht die durch Noradrenalin induzierte cAMP-Synthese . . . . .	109

---

<b>4 Diskussion</b>	<b>117</b>
4.1 Glukose induziert differenzierte Genexpression auf Ebene der Transkription	118
4.2 Glukose induziert den Cholesterin-Biosyntheseweg . . . . .	119
4.3 IRS1 und INSIG1 sind verlässlich Glukose-abhängig expriert . . . . .	120
4.4 Glukose vermindert die IGF-1-induzierte Menge von phospho-ERK in mHypoA- 2/10-Zellen und phospho-CREB in GT1-7-Zellen . . . . .	121
4.5 Einfluss von Glukose auf die RHO-Aktivität bleibt unklar . . . . .	122
4.6 Glukose verstärkt Noradrenalin-abhängige cAMP-Akkumulation . . . . .	123
4.7 Mechanismen der Glukose-induzierten Genexpression . . . . .	125
4.8 Limitationen und weiterführende Forschungen . . . . .	129
4.9 Zusammenfassung . . . . .	131
<b>Danksagung</b>	<b>153</b>



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Blutzuckertagesprofil . . . . .	4
2.1	Rho-Assay . . . . .	33
3.1	Verteilung der Sequenzlängen . . . . .	39
3.2	Verteilung der Basen je Basenposition . . . . .	40
3.3	Verteilung der GC-Anteile der Sequenzen . . . . .	41
3.4	GC-Anteil je Basenposition . . . . .	42
3.5	Verteilung des Anteils uneindeutig bestimmter Basen . . . . .	43
3.6	Anteil uneindeutig bestimmter Basen je Basenposition . . . . .	44
3.7	Häufigkeitsverteilung des durchschnittlichen Phred Scores . . . . .	45
3.8	95%-Konfidenzintervall des Phred Scores pro Basenposition . . . . .	46
3.9	Mehrfach vorkommende Sequenzen . . . . .	47
3.10	Angereicherte Nukleotid-Pentamere . . . . .	48
3.11	Volcano Plot RNA-Sequenzierung . . . . .	50
3.12	Enzyme der Cholesterin-Biosynthese . . . . .	51
3.13	Ungefaltete Protein-Antwort (Unfolded Protein Response) . . . . .	52
3.14	Phospholipasen . . . . .	54
3.15	Einfluss der cDNA-Verdünnung der Referenzgene auf den RNA-Nachweis . . . . .	56
3.16	Insulin- und IGF-Signalweg . . . . .	59
3.17	INSIG . . . . .	60
3.18	Ras-GTPasen mit GEFs und GAP . . . . .	63
3.19	RAF-Kinasen . . . . .	65
3.20	SRE: <i>Srf</i> und <i>Elk</i> . . . . .	67
3.21	<i>Creb</i> und <i>Crtc</i> . . . . .	71
3.22	<i>Stat</i> und <i>Socs</i> . . . . .	75
3.23	RAB-GTPasen . . . . .	80
3.24	<i>TBC1D-Familie</i> . . . . .	83
3.25	<i>Rap-Familie</i> . . . . .	86
3.26	<i>Rho-Familie</i> . . . . .	89
3.27	$\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine . . . . .	92
3.28	Adenylatzyklen . . . . .	94
3.29	Glukosetransporter . . . . .	96

3.30	Sirtuine . . . . .	100
3.31	<i>Leprot</i> und <i>Leprotl1</i> . . . . .	101
3.32	<i>S100a10</i> . . . . .	102
3.33	Heatmap RNA-Sequenzierung und RT-qPCR . . . . .	104
3.34	Dosis-Wirkungs-Kurve von <i>Irs1</i> und <i>Irs2</i> sowie <i>Insig1</i> und <i>Insig2</i> nach 3 Stunden normiert auf <i>Sdha</i> . . . . .	106
3.35	Dosis-Wirkungs-Kurve von <i>Irs1</i> und <i>Irs2</i> sowie <i>Insig1</i> und <i>Insig2</i> nach 24 Stunden normiert auf <i>Sdha</i> . . . . .	106
3.36	Glukose-abhängige Proteinexpression von IRS1 und INSIG1 . . . . .	110
3.37	Glukose-abhängige Proteinexpression von IRS1 in GT1-7 Zellen . . . . .	111
3.38	Glukose-abhängige IGF-1-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung . . . . .	112
3.39	Glukose-abhängige IGF-1-induzierte CREB-Phosphorylierung . . . . .	113
3.40	RHO-Aktivität . . . . .	114
3.41	cAMP-Akkumulation nach Glukose/ $\alpha$ -MSH/Noradrenalin/Forskolin . . . . .	115
4.1	Adenylatzyklasen in der RNA-Sequenzierung . . . . .	125
4.2	Phosphodiesterasen in der RNA-Sequenzierung . . . . .	126
4.3	Heterotrimere G-Proteine in der RNA-Sequenzierung . . . . .	127
4.4	$\beta_2$ -Adrenorezeptor in der RNA-Sequenzierung . . . . .	128
4.5	Mlxip und Mlx in der RNA-Sequenzierung . . . . .	129

# Tabellenverzeichnis

1.1	Glukosetransporter . . . . .	5
2.1	<b>Verwendete Zelllinien</b> . . . . .	15
2.2	<b>Verwendete Zellkulturmedien sowie deren Zusätze</b> . . . . .	16
2.3	<b>Verwendete Geräte</b> . . . . .	17
2.4	<b>Verwendete Verbrauchsmaterialien</b> . . . . .	18
2.5	<b>Verwendete Chemikalien</b> . . . . .	19
2.6	<b>Verwendete radioaktive Moleküle</b> . . . . .	21
2.7	<b>Verwendete Primärantikörper</b> . . . . .	21
2.8	<b>Verwendete Sekundärantikörper (Meerrettichperoxidase-konjugiert)</b>	21
2.9	Primersequenzen . . . . .	22
2.9	Primersequenzen . . . . .	23
2.9	Primersequenzen . . . . .	24
2.9	Primersequenzen . . . . .	25
2.9	Primersequenzen . . . . .	26
2.10	Western Blot Chemikalien . . . . .	31
2.11	<b>cAMP-Assay</b>	
	Im Rahmen des cAMP-Akkumulations-Assays verwendete Wirkstoffe und deren Konzentrationen. . . . .	35
3.1	RNA-Konzentrationen und Qualitätsindizes der einzelnen Proben . . . . .	38
3.2	RNA-Sequenzierung: Anzahl unterschiedlich exprimierter Gene . . . . .	49
3.3	Durch Glukose in ihrer Expression hochsignifikant beeinflusste Gene . . . . .	105



# Zusammenfassung

Die Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus Typ 2 und deren Folgeerkrankungen stellen eine große Belastung für den einzelnen Patienten und die Gesundheitsversorgung im Allgemeinen dar. Es ist somit im Interesse aller, die Pathogenese dieser Erkrankung besser zu verstehen, um neue Ansatzpunkte für verbesserte Therapien zu finden. Als ursächlich für den Typ 2 Diabetes gilt neben weiteren Faktoren das Überangebot an Zucker in den heutigen Industrienationen in Kombination mit prädisponierenden genetischen Veränderungen, die im Ergebnis zu einer Erschöpfung der Insulinproduktion in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas und einer verminderten Insulinsensitivität der Glukose-aufnehmenden Gewebe führen. Die Folge ist ein dauerhaft krankhaft erhöhter Blutglukosespiegel. Die  $\beta$ -Zellen, die den Blutglukosespiegel messen können und das Insulin produzieren, sind hierbei von zentraler Bedeutung. Neuere Erkenntnisse weisen jedoch auch auf einen regulativen Einfluss des Gehirns hin, insbesondere des Hypothalamus als Stoffwechselsteuerungszentrum. Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, herauszufinden, wie unterschiedliche Glukosekonzentrationen auf die Genexpression der hypothalamischen Zelllinie mHypoA-2/10 wirken. Die mHypoA-2/10-Zellen wurden in unterschiedlichen Glukosekonzentrationen kultiviert. Anschließend wurde eine genomweite RNA-Sequenzierung durchgeführt, wobei sich 831 Gene um mindestens 50% hoch- und 1390 Gene um mindestens 50% herunterreguliert zeigten. In der Analyse der Signal- und Biosynthesewege zeigte sich der Cholesterin-Biosyntheseweg als der am stärksten durch Glukose hochregulierte Syntheseweg. Im nächsten Schritt wurde die Expression von über 100 Genen mittels RT-qPCR kontrolliert. Hierbei zeigten sich *Irs1*, *Igf1r*, *Insig1*, *Elk3*, *Tbc1d4*, *Tbc1d16*, *Tbc1d31*, *Rap2a*, *Rap2b*, *Arhgef2*, *Gnai2*, *Adcy6* und *S100a10* als verlässlich durch Glukose in ihrer Expression beeinflusste Gene. Außerdem wurden für ausgewählte Gene/Proteine Western Blots durchgeführt, um die auf RNA-Ebene beobachteten Effekte auf Protein-Ebene zu kontrollieren. Ein eindeutiger Effekt der Glukose auf die durch RHO vermittelte Signaltransduktion konnte nicht nachgewiesen werden. Schließlich wurde noch eine glukoseabhängige cAMP-Akkumulation nach Noradrenalin-Stimulation beobachtet, die möglicherweise im Zusammenhang mit der hochregulierten Adenylatzyklase 6 steht. Die vorliegende Arbeit weist auf eine differenzierte Beeinflussung der Genexpression hypothalamischer Zellen durch Glukose hin. Veränderte Glukosekonzentrationen im Interstitium, wie sie bei Diabetikern und Prädiabetikern zu erwarten sind, könnten also u.a. durch ihren Einfluss auf die Genexpression wichtiger Regulationszentren des Gehirns zur Störung des Stoffwechsels des gesamten Organismus führen und damit einen wesentlichen Beitrag zur Entwicklung und Progredienz des Diabetes

mellitus leisten.

# Summary

The metabolic disease diabetes mellitus type 2 and its related illnesses represent a major burden for individual patients and healthcare in general. It is therefore in everyone's interest to better understand the pathogenesis of this disease in order to find new starting points for improved therapies. The causes of type 2 diabetes, among other factors, is the oversupply of sugar in today's industrialised countries in combination with predisposing genetic changes, resulting in a depletion of insulin production in the  $\beta$ -cells of the pancreas and reduced insulin sensitivity of the glucose-absorbing tissues. The result is a permanently abnormally high blood glucose level. The  $\beta$ -cells, which can measure the blood glucose level and produce insulin, are of central importance here. However, more recent findings also point to a regulatory influence of the brain, in particular the hypothalamus as a metabolic control centre. The aim of this study was therefore to find out how different glucose concentrations affect the gene expression of the hypothalamic cell line mHypoA-2/10.

The mHypoA-2/10 cells were cultivated in different glucose concentrations. Genome-wide RNA sequencing was then carried out, which revealed that 831 genes were upregulated by at least 50 % and 1390 genes were downregulated by at least 50 %. In the analysis of the signalling and biosynthetic pathways, the cholesterol biosynthetic pathway was found to be the pathway most strongly upregulated by glucose. In the next step the expression of over 100 genes was checked using RT-qPCR. This revealed *Irs1*, *Igf1r*, *Insig1*, *Elk3*, *Tbc1d4*, *Tbc1d16*, *Tbc1d31*, *Rap2a*, *Rap2b*, *Arhgef2*, *Gnai2*, *Adcy6* and *S100a10* as genes whose expression is reliably influenced by glucose. In addition, Western blots were performed for selected genes/proteins in order to control the effects observed at the RNA level at the protein level. A clear effect of glucose on the signalling transduction mediated by RHO could not be demonstrated. Finally, glucose-dependent cAMP accumulation was observed after noradrenaline stimulation, which may be related to the upregulated adenylate cyclase 6.

The present study indicates a differentiated influence of glucose on the gene expression of hypothalamic cells. Altered glucose concentrations in the interstitium, as are to be expected in diabetics and prediabetics, could therefore lead to a disturbance of the metabolism of the entire organism through their influence on the gene expression of important regulatory centres of the brain and thus make a significant contribution to the development and progression of diabetes mellitus.



# Kapitel 1

## Einleitung

Der Stoffwechsel des Menschen war über Jahrtausende daran angepasst, den Fortbestand des Organismus und der Spezies angesichts eines begrenzten oder mangelhaften Nahrungsangebots zu erhalten. In der heutigen industrialisierten Welt mit ihrem annähernd jederzeit verfügbaren und schier unbegrenzten Nahrungsangebot sieht sich der menschliche Körper jedoch einer Situation ausgesetzt, für die er nicht gemacht zu sein scheint. Im Zusammenhang mit dieser menschheitsgeschichtlich gesehen relativ neuen Ernährungsweise tritt in der Bevölkerung eine Reihe von Symptomen auf, die unter dem Begriff *Metabolisches Syndrom* zusammengefasst werden und als Zeichen der Überforderung des Körpers mit dieser historischen Ausnahmesituation angesehen werden kann. In die aktuelle Definition der *International Diabetes Federation* von 2006 für das Metablistche Syndrom fließen als Symptome neben zentral betonter Fettleibigkeit auch erhöhte Blutfette, erniedrigtes HDL-Cholesterin, Bluthochdruck und ein erhöhter Blutglukosespiegel bzw. ein bereits diagnostizierter Diabetes mellitus Typ 2 hinein (Zimmet *et al.* , 2005; Alberti *et al.* , 2006). Die Folgen des Metabolischen Syndroms sind insbesondere Herz-Kreislaufkrankungen, die in Deutschland mit ungefähr einem Drittel aller Todesfälle die Todesurasache Nummer eins, noch vor Krebserkrankungen, darstellen (StatistischesBundesamt, 2022).

Frei nach Paracelsus heißt es “Die Dosis macht das Gift”.<sup>1</sup> Gemäß dieses Grundsatzes ist in der Vergangenheit bereits eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt worden, ob und inwiefern möglicherweise einzelne Komponenten unserer Nahrung, durch das aktuelle Überangebot "überdosierte", einen schädlichen, gar toxischen Einfluss auf unseren Organismus sowie dessen Stoffwechsel nehmen. Als schädlich wurden zunächst einzelne Fette angesehen, die naheliegenderweise eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung des Metabolischen Syndroms spielen (Lissner & Heitmann, 1995; Field *et al.* , 2007). Aber auch die Kohlenhydrate gerieten ins Visier der Forschung (Johnson *et al.* , 2007). Mit dem Ergebnis, dass mittlerweile “Zucker” von Laien als “ungesund” angesehen wird (Zühlsdorf *et al.* , 2021). Im Zusammenhang mit der Metabolisierung von Fetten und Zuckern spielen die Leber und das Pankreas als wichtige Stoffwechselorgane eine zentrale Rolle. Und so sind die dortigen Abläufe intensiv untersucht worden. Die Literatur legt jedoch nahe, dass noch

---

<sup>1</sup>Theophrast Paracelsus: Werke. Bd. 2, Darmstadt 1965, S. 508-513.  
<http://www.zeno.org/nid/20009261362> aufgerufen am 14.08.2023.

ein weiteres Organ ebenfalls eine zentrale Rolle im Stoffwechsel spielt: Das Gehirn (Deem *et al.*, 2017). Hier sind die Abläufe, die in die Entwicklung des Metabolischen Syndroms involviert sind, weit weniger gut verstanden. Die Erkenntnisse der Forschung weisen jedoch darauf hin, dass auch das Gehirn in den Stoffwechsel eingreift und dabei ebenfalls so bedeutsam wie Leber und Pankreas ist (Alonge *et al.*, 2021). Ein in diesem Zusammenhang wichtiges Zentrum des Gehirns ist der Hypothalamus, der ähnlich einer Steuerungszentrale des Metabolismus agiert und somit bei der Untersuchung der Entstehung des Diabetes mellitus und des Metabolischen Syndroms nicht außer Acht gelassen werden sollte. Neben den bereits angesprochenen Faktoren der Nahrung und der Lebensgewohnheiten, die zur Entwicklung des Metabolischen Syndroms beitragen, spielt außerdem eine genetische Prädisposition eine Rolle, die bei entsprechenden Umweltverhältnissen die Manifestation der Erkrankung begünstigt (Povel *et al.*, 2011).

Es lässt sich also festhalten, dass die *Glukose*, das *Gehirn* und die *Genetik* wichtige Aspekte bei der Krankheitsentwicklung des Metabolischen Syndroms und des Diabetes mellitus Typ 2 darstellen, deren genaues Zusammenwirken allerdings noch nicht besonders gut verstanden ist. Diese Arbeit soll nun dazu beitragen, das Zusammenwirken dieser drei Faktoren besser zu verstehen, indem der Einfluss unterschiedlicher *Glukosekonzentrationen* auf die *Genexpression* hypothalamischer *Gehirnzellen* untersucht wird.

## 1.1 Physiologie des Glukosestoffwechsels und Dynamik des Blutglukosespiegels

Der wesentliche Energielieferant der Zelle ist das Adenosintriphosphat (ATP). Bei der hydrolytischen Spaltung des ATP in Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat wird Energie frei, die für chemische Prozesse genutzt werden kann, die Energie benötigen. Indem also die Hydrolyse des ATP an andere chemische Prozesse gekoppelt wird, kann diese Energie nutzbar gemacht werden. Dieser Vorgang wird auch “energetische Kopplung” genannt. 90% des ATP wird von den Zellen selbst in deren Mitochondrien synthetisiert. Das für diesen Prozess zuständige Enzym, die ATP-Synthase wiederum wird durch einen Protonengradienten angetrieben, der mit Hilfe der Atmungskette aufrechterhalten wird. Für die Aufrechterhaltung des Protonengradienten benötigt die Atmungskette Energie, welche von Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) bereitgestellt wird. Das NADH entsteht durch die Oxidation der Makronährstoffe (Fettsäuren, Kohlenhydrate und Aminosäuren), welche über die Nahrung dem Organismus zugeführt werden, zu  $\text{CO}_2$ , welches wiederum über die Atmung an die Außenwelt abgegeben wird (Rassow, 2022).

Die Kohlenhydrate werden im Wesentlichen über die Nahrung in Form von Stärke und Zucker in den Organismus aufgenommen. Bereits im Mundraum beginnt die Verdauung der Polysaccharide durch die im Speichel enthaltene  $\alpha$ -Amylase, ein Enzym, welches ebenfalls im Pankreassaft enthalten ist. Die Oligo- und Disaccharide werden sodann am Bürstensaum der Enterozyten durch Enzyme, wie die Maltase-Glukoamylase, Saccharase-Isomaltase oder die Laktase, in Monomere gespalten. An der apikalen Zellmembran der Enterozyten wer-

den diese monomeren Zucker im Anschluss resorbiert. Dies geschieht über verschiedene Transporter, wie den Natrium Glukose Transporter 1 (SGLT1) welcher, angetrieben durch den von der Natrium-Kalium-ATPase aufrechterhaltenen Natriumkonzentrationsgradienten, sekundär-aktiv Glukose oder Galaktose mittels Symport mit zwei Natrium-Ionen über die apikale Zellmembran transportiert. Bei Fruktose passiert dies dagegen mittels erleichterter Diffusion über den Glukose-Transporter 5 (GLUT 5). An der basolateralen Zellmembran der Enterozyten werden die Monomere dann über GLUT 2 mittels erleichterter Diffusion an den Blutkreislauf abgegeben. Entsprechend steigt auch die Blutglukosekonzentration, landläufig als "Blutzucker" bekannt. So lassen sich über den Tagesverlauf Blutzuckerspitzen nach der Nahrungsaufnahme beobachten. Während beim Gesunden der Blutzucker in nüchternem Zustand definitionsgemäß nach acht Stunden Nahrungskarenz zwischen 3,1 und 5,6 mM liegen sollte, darf zwei Stunden nach Nahrungsaufnahme (in der klinischen Diagnostik simuliert durch die Gabe von 75 g Glukose im Rahmen des oralen Glukosetoleranztests, kurz oGTT), die Konzentration von 7,8 mM Glukose im Blut nicht überschritten werden, um als gesund zu gelten (Bundesärztekammer (BÄK), 2023). Wie sich der Blutzucker in Abhängigkeit von Tageszeit und Nahrungsaufnahme verhält, ist in Abbildung 1.1 dargestellt (Daly *et al.*, 1998).

Der nach der Nahrungsaufnahme erhöhte Blutzuckerspiegel sinkt im Anschluss wieder, da die Monosaccharide aus dem Blut in verschiedene Zellen des Organismus aufgenommen werden, insbesondere in Leber-, Skelettmuskel- und Fettzellen, sowie in Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) und in die roten Blutkörperchen (Erythrozyten).

Über die Blutgefäße des Darms und die Vena portae gelangen die Monosaccharide als erstes zur Leber. Hier werden sie insulinunabhängig über GLUT 2 in die Leberzellen, die Hepatozyten, aufgenommen. Die Aufnahme von Glukose in Skelettmuskel- und Fettzellen dagegen geschieht über den GLUT 4, welcher insulinabhängig in die Plasmamembran der Zellen eingebaut wird. Die Zellen des ZNS und die Erythrozyten wiederum nehmen die Glukose, auf die sie als ihrem einzigen Energielieferanten permanent angewiesen sind, über GLUT 1 (Erythrozyten, Endothelzellen, Astrozyten) und GLUT 3 (Nervenzellen) insulinunabhängig auf (Hauser, 2022). Eine Übersicht über die wichtigsten Glukosetransporter findet sich in Tabelle 1.1.

### 1.1.1 Inselzell-zentriertes Regulationsmodell des Glukosestoffwechsels

Insulin ist ein Peptidhormon und wird in den  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas gebildet und von dort in den Blutkreislauf abgegeben. Während die Leber als zentrales Energiespeicher- und Energieverteilungsorgan sowie die besonders vulnerablen Gewebe des ZNS und die mitochondrienfreien Erythrozyten die Glukose insulinunabhängig aufnehmen, nehmen die Skelettmuskel- und Fettzellen die Glukose insulinabhängig auf. Insulin senkt dadurch den Blutzuckerspiegel und führt zum Aufbau von Kohlenhydrat und Fettspeichern in Form von Glykogen und Triacylglycerinen. Aufgrund dieses Umstandes wird es als anaboles Hormon angesehen.

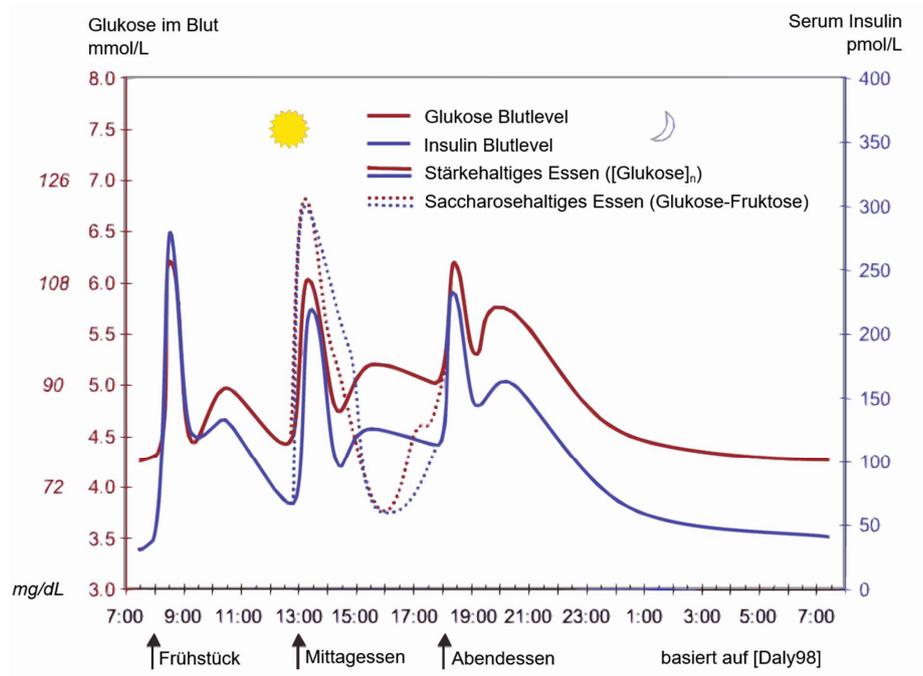


Abbildung 1.1: **Blutzuckertagesprofil**

Vereinfachte Darstellung des Blutzuckertagesprofils in Abhängigkeit von Tageszeit und Nahrungsaufnahme nach (Daly *et al.*, 1998). Von Jakob Suckale, Michele Solimenaderivative work: Shaddim - Suckale08 fig3 glucose insulin day.jpg, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=13371861>.

Die Wirkungsweise des Insulins macht es notwendig, dass seine Sekretion entsprechend des Energieangebots reguliert wird, da es sonst zu unphysiologischen Steigerungen oder Erniedrigungen des Blutzuckers kommen würde, was sich bei erkrankten Patienten in lebensgefährlichen Hyper- oder Hypoglykämien äußern kann. Als Maß für das Energieangebot und als primärer Stimulus für die Insulinsekretion dient dem Körper die Blutglukosekonzentration. Weiterhin wird die Insulinsekretion durch die so genannten Enterohormone, wie z.B. Glucagon-like-Peptide-1 (GLP-1) und gastroinhibitorisches Peptid (GIP), Somatostatin und das vegetative Nervensystem beeinflusst (Staiger *et al.*, 2014).

Die Messung der Blutglukosekonzentration und die reaktive Ausschüttung von Insulin laufen gemäß des Inselzell-zentrierten Regulationsmodells in ein und der selben Art von Zellen ab, den bereits erwähnten  $\beta$ -Zellen. Diese nehmen die Glukose insulinunabhängig über einen Glukosetransporter auf. Hierbei unterscheiden sich Nager, deren Zellen in der vorliegenden Arbeit untersucht worden sind, vom Menschen. Während bei den Nagern der

Tabelle 1.1: Glukosetransporter

Name	Vorkommen	Insulin	Glukose-affinität	Funktion
GLUT 1	ubiquitär, $\beta$ -Zellen	unabhängig	hoch	kontinuierliche Glukoseaufnahme, Sicherstellung der Energieversorgung (insb. von Erythrozyten und ZNS-Nervenzellen)
GLUT 2	Leber	unabhängig	niedrig	Regulation der Blutglukosekonzentration durch Glukoseaufnahme in Abhängigkeit von der Blutglukosekonzentration
GLUT 3	ZNS, $\beta$ -Zellen	unabhängig	hoch	basale Glukoseversorgung des ZNS
GLUT 4	Skelettmuskulatur, Fettzellen	abhängig (in arbeitenden Muskelzellen auch unabhängig)		bedarfsorientierte Glukoseversorgung der Skelettmuskel- und Fettzellen
GLUT 5	Dünndarm, Niere, Spermatozoen		spezifisch für Fruktose	Fruktosetransport

abgewandelt nach K. Hauser: Funktion biologischer Membranen in Rassow et al., Duale Reihe Biochemie, 4. Aufl., Stuttgart 2016, S. 366, Tab. B-4.1.

Glukosetransport hauptsächlich über GLUT 2 geschieht, der eine geringere Affinität zur Glukose hat und sie damit abhängig von ihrer Blutglukosekonzentration in die  $\beta$ -Zelle aufnimmt, wird beim Menschen die Glukose hauptsächlich über GLUT 1 und GLUT 3 in die  $\beta$ -Zellen aufgenommen, die eine deutlich höhere Affinität zur Glukose haben, weshalb ihre Transportaktivität weniger von der Blutglukosekonzentration abhängig ist. Im Zytoplasma angekommen, wird die Glukose durch die Glukokinase phosphoryliert. Über die Stoffwechselwege der Glykolyse, des Citratzyklus und der Atmungskette wird die Glukose in der  $\beta$ -Zelle vollständig abgebaut, wobei pro Glukosemolekül rechnerisch etwa 30-32 ATP-Moleküle gewonnen werden können. Die ATP-Synthese ist dabei proportional zur Blutglukosekonzentration. Das durch den Abbau der Glukose anfallende ATP hemmt den ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanal, was zur Depolarisation der  $\beta$ -Zellmembran führt. Dies wiederum bedingt das Öffnen von  $Ca^{2+}$ -Kanälen. Das in die  $\beta$ -Zelle einströmende  $Ca^{2+}$  löst dann die Exozytose des in Speichergranula gelagerten Insulins aus der  $\beta$ -Zelle ins Blut aus. Von hier gelangt das Insulin zu den Zielzellen und kann dort seine Wirkung entfalten. Als

Ergebnis sinkt die Blutglukosekonzentration. Dies wiederum führt zu einer verminderten ATP-Produktion in den  $\beta$ -Zellen und dadurch zu einer verminderten Insulin-Ausschüttung.

Auf den ersten Blick bietet das Inselzell-zentrierte Regulationsmodell eine umfassende Erklärung für die Regulation des Blutglukosespiegels über die Ausschüttung von Insulin inklusive Feedback-Schleife, sodass man meinen könnte, es bedürfe nur geringfügiger Korrekturen der Insulinausschüttung durch andere Hormone oder das vegetative Nervensystem. Tatsächlich ist jedoch davon auszugehen, dass die Regulation der Insulinausschüttung und der Blutglukosekonzentration weitaus komplexer ist, als dieses Modell suggeriert. Im folgenden Abschnitt wird deshalb die zentrale Rolle, die das Gehirn bei der Regulation der Insulinausschüttung und der Blutglukosekonzentration spielen könnte, behandelt.

### 1.1.2 Gehirn-zentriertes Regulationsmodell des Glukosestoffwechsels

Das Gehirn als solches ist in Bezug auf seinen Energiestoffwechsel ein besonderes Organ, da es zu den wenigen Organen gehört, die ihren Energiebedarf fast ausschließlich durch Glukose decken. Diese muss dem Gehirn kontinuierlich über das Blut zugeführt werden, da das Gehirn selbst nur über wenige Glykogenspeicher verfügt. Im Hungerzustand kann das Gehirn seinen Energiebedarf auch teilweise durch Ketonkörper decken. Ganz ohne Glukose kann das Gehirn aber auch dann nicht überleben. Das Gehirn ist also äußerst abhängig vom Blutglukosespiegel und kann eine Unterversorgung nur unvollständig kompensieren. Eine Regulation der Blutglukosekonzentration durch das Gehirn bedeutet also auch eine Einflussnahme des Gehirns auf seine eigene Energieversorgung, deren Gewährleistung sowohl für das Organ selbst als auch für den Organismus als Ganzes überlebenswichtig ist. Zudem laufen im Gehirn alle Informationen des vegetativen und somatischen Nervensystems zusammen, sodass durch Integration sowohl der vegetativen als auch der somatischen Seite der Stoffwechsel den Anforderungen des Organismus als Ganzem angepasst werden kann. So passt das Pankreas seine Insulinsekretion der Blutglukosekonzentration an, kann aber nicht direkt detektieren, wenn somatische Reize auf einen vermehrten Energiebedarf hindeuten. Die Prüfungssituation z.B. und der damit verbundene vermehrte Energiebedarf des Gehirns kann von der  $\beta$ -Zelle nicht detektiert werden, wohl aber durch das Zusammenwirken von somatischem Nervensystem und informationsintegrierenden Zentren des Gehirns. Die folgende vegetative Reaktion des autonomen Nervensystems wiederum hat dann Auswirkungen auf die pankreatische Insulinsekretion. Eine entsprechende Einflussnahme des Gehirns scheint also nur konsequent.

Wie die  $\beta$ -Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas, gibt es auch im Gehirn Neurone, die Glukosekonzentrationen "messen" können. Auch diese Neuronen exprimieren einen ATP-abhängigen Kalium-Kanal, der, je nachdem wie viel ATP durch die Verstoffwechslung von Glukose bereit steht, das Membranpotential der Zelle beeinflusst. Dies führt in diesem Fall aber nicht zur Freisetzung von Insulin, sondern in Abhängigkeit von der Nervenzellart zur Depolarisation oder Hyperpolarisation. Diese Glukose-sensitiven Neurone finden sich insbesondere im Hypothalamus. Eine mögliche, in der Literatur diskutierte

Rolle, die das Gehirn spielen könnte, ist die gegenseitige Abstimmung von Insulinsekretion des Pankreas und Insulinsensitivität der peripheren Gewebe (insbesondere Muskel- und Fettgewebe) aufeinander. Wie es in Situationen, in denen sich die Anforderungen an die Balance dieser Faktoren relativ rasch ändern, z.B. im Rahmen der Thermoregulation beim Einsetzen nächtlicher Kälte, notwendig ist. Gerade in Bezug auf die Thermoregulation spielt auch wieder der Hypothalamus eine zentrale Rolle, indem er die Signale peripherer Thermorezeptoren empfängt und mit einer sympathischen Aktivierung von Muskel- und Fettgewebe zur Wärmeerzeugung beantwortet (Deem *et al.* , 2017).

## 1.2 Pathologie des Glukosestoffwechsels

### 1.2.1 Bedeutung eines pathologisch veränderten Glukosestoffwechsels in ausgewählten Krankheitsbildern

#### Metabolisches Syndrom

In den Industrieländern, und auch in vielen Schwellenländern, steigt der Anteil der Menschen mit Adipositas, d.h. Menschen mit einem BMI von mindestens 30 kg/m<sup>2</sup> seit Jahrzehnten stetig an.<sup>2</sup> Es ist zu erwarten, dass dieser Anteil auch in den kommenden Jahren weiter steigen wird, sollte es nicht zu umfassenden politischen und gesellschaftlichen Veränderungen hin zu einer gesünderen Lebensweise in der Breite der Bevölkerung kommen. Diese Entwicklung stellt die Gesundheitsversorgung vor eine große Herausforderung, da Adipositas mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergeht (Peeters *et al.* , 2003). Doch nicht nur die Prävalenz der Adipositas steigt, sondern auch die des mit ihr vergesellschafteten Metabolischen Syndroms (Saklayen, 2018). Dies kann als Grund dafür angesehen werden, dass in den Industrienationen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie bereits erwähnt, die häufigste Todesursache nach Tumorerkrankungen darstellen (Statistisches Bundesamt, 2022). Gerade angesichts des demographischen Wandels, der zu einer immer älterwerdenden Bevölkerung führt, sind diese Entwicklungen besorgniserregend. Es liegt also im allgemeinen Interesse, die pathogenetischen Mechanismen, die zum Metabolischen Syndrom und dessen zugehörigen Krankheiten, wie Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2, führen, näher zu verstehen, um mögliche Therapien oder Präventionsmaßnahmen zu entwickeln. Aktuell steht bei der Therapie des Metabolischen Syndroms immer noch die Änderung des Lebensstils an erster Stelle (Bundesärztekammer (BÄK), 2023; Deutsche Adipositas-Gesellschaft, 2014), auch wenn diese aufgrund mangelnder Compliance in den meisten Fällen nicht zum Erfolg führt (Dalle Grave *et al.* , 2005). Es ist also dringend notwendig, Therapeutika zu entwickeln, die denjenigen Patienten helfen, die ihren Lebensstil nicht ändern können oder wollen als auch denjenigen, die von einer Änderung ihres Lebensstils nicht profitieren.

---

<sup>2</sup><https://ourworldindata.org/grapher/share-of-adults-defined-as-obese> aus Hannah Ritchie and Max Roser (2017) - "Obesity". Published online at OurWorldInData.org. Retrieved from: 'https://ourworldindata.org/obesity' aufgerufen am 14.08.2023.

## Diabetes mellitus

Wie oben bereits erwähnt, gehört zum Metabolischen Syndrom unter anderem die gestörte Glukosetoleranz bzw. die Insulinresistenz. Beides sind Phänomene, die zu einer erhöhten Glukosekonzentration im Blut, einem erhöhten "Blutzucker", führen, das Leitsymptom der Krankheit, die gemeinhin als Diabetes mellitus bekannt ist. Und so verwundert es nicht, dass Patienten, die an einem Metabolischen Syndrom leiden, oftmals auch die Diagnosekriterien des Diabetes mellitus erfüllen. Beim Diabetes mellitus unterscheidet man im Wesentlichen zwei Typen. Zum einen den Typ 1, auch als juveniler Diabetes bezeichnet, der die Folge einer Autoimmunreaktion gegen die körpereigenen  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas ist, die zum Untergang der Insulin-produzierenden Zellen führt. Und zum anderen den Typ 2, auch als adulten Diabetes bezeichnet, der die Folge eines Wechselspiels aus in frühen Krankheitsphasen erhöhter Insulinausschüttung und Insulinresistenz ist und schließlich ebenfalls wie der Typ 1 zum Untergang der  $\beta$ -Zellen führt, sodass es in späteren Krankheitsphasen zu Insulinmangel kommt. Im Rahmen des Metabolischen Syndroms ist vor allem der Diabetes mellitus Typ 2 von Bedeutung. Insofern ist auch das Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankung zur Erklärung des Metabolischen Syndroms wichtig. Interessant ist, dass es bei der Entstehung des Diabetes mellitus eine starke genetische Komponente gibt. Die Pathophysiologie des Diabetes mellitus ist noch nicht abschließend geklärt. Die anerkannte Lehrbuchmeinung ist allerdings, dass die zentrale Ursache eine Überernährung ist, die in der Folge zu Übergewicht und einer vermehrten Insulinausschüttung führt. Die vermehrte Insulinausschüttung wiederum führt dann zu einer Insulinresistenz der Gewebe, wie Muskel- oder Fettzellen, die die Glukose eigentlich Insulinvermittelt aufnehmen und dadurch den Blutzuckerspiegel senken sollten. Das Ergebnis ist ein erhöhter Glukosespiegel im Blut (Mann *et al.* , 2018).

Zentral bei diesem ätiopathogenetischen Erklärungsansatz sind das Pankreas sowie die peripheren Glukose-aufnehmenden Gewebe (Insel-zentriertes Modell). Doch es gibt auch Hinweise, dass das Gehirn und insbesondere der Hypothalamus, als zentrales Steuerungsorgan des Stoffwechsels, ebenfalls in die Entstehung des Diabetes mellitus involviert sein könnte (Gehirn-zentriertes Modell) (Deem *et al.* , 2017).

### 1.2.2 Rolle des Gehirns bei der Entwicklung einer pathologisch veränderten Glukosehomöostase

Untersuchungen der Vergangenheit konnten zeigen, dass das Gehirn eine Rolle bei der Erhaltung der Glukosehomöostase spielt. Zum einen wurden Glukose-empfindliche Nervenzellen entdeckt, die durch Glukose entweder erregt oder gehemmt werden. Zum anderen wurden Nervenzell-Schaltkreise identifiziert, die entweder bei Hypoglykämie oder bei Hyperglykämie aktiviert werden und über wenig verstandene Mechanismen zu einer Normalisierung der Blut-Glukose-Konzentration auf ein physiologisches Niveau führen. Über die intracerebroventrikuläre Gabe verschiedener Faktoren, wie Leptin oder Fibroblast Growth Factor, konnten sogar Krankheitsremissionen über längere Zeitabschnitte in Diabetes-Modellen erreicht werden. Für die Erklärung der Glukose-Homöostase unter

konstanten Bedingungen genügt das Insel-zentrierte Modell. In Situationen, in denen die Glukose-Homöostase, z.B. durch Stress wie Kälteexposition, herausgefordert wird, kommt das Insel-zentrierte Modell jedoch an seine Grenzen und die Rolle des Gehirns als zentrales Steuerungsorgan im Sinne eines Gehirn-zentrierten Modells tritt in den Vordergrund. Während nach der Nahrungsaufnahme die Blut-Glukose-Konzentration kurzfristig ansteigt und direkt über die  $\beta$ -Zellen des Pankreas zu einer vermehrten Insulinsekretion und damit zu einer vermehrten Glukose-Aufnahme in die peripheren Gewebe führt, bleibt bei der Kälteexposition die Blut-Glukose-Konzentration weitestgehend konstant, obwohl es zu einem erhöhten Energieverbrauch der Wärme-erzeugenden Gewebe wie z.B. Muskel oder braunem Fett kommt. Es ist also ein Vermittler notwendig, der die Insulinsekretion der  $\beta$ -Zellen und die Insulinsensitivität der peripheren Gewebe an die gegebene Situation anpasst und so die Blut-Glukose-Konzentration auf einem Normalniveau hält.

Im Rahmen des Gehirn-zentrierten Modells wird die Entwicklung des Diabetes mellitus Typ 2 entsprechend so erklärt, dass sich das vom Gehirn angestrebte Normalniveau langsam nach oben über den physiologischen Bereich hinaus entwickelt, gleichsam einer graduellen Verschiebung des Zielwerts. Ursächlich für eine derartige Verschiebung könnten Defekte der entsprechenden Gehirnzentren sein, die dazu führen, dass die Blutglukosekonzentration falsch eingeschätzt wird und/oder auf zu hohe Konzentrationen inadäquat reagiert wird. Das Ergebnis wäre eine unzureichende Absenkung des Blutzuckers mit Ausbleiben einer vollständigen Normalisierung. Zur Aufrechterhaltung einer homöostatischen Stoffwechsellage würden die Steuerzentren des Gehirns nun eben den erhöhten, pathologischen Zielwert zu halten versuchen.

Wie aber spielen die postulierten Defekte in den neuronalen Stoffwechselsteuerungszentralen des Gehirns mit den nachgewiesenen Defekten der  $\beta$ -Zellen des Pankreas zusammen? Im Gegensatz zu anderen endokrinen Organen, wie z.B. denen der Hypothalamus-Hypophysen-Achse, ist bislang kein  $\beta$ -Zell-stimulierendes Hormon entdeckt worden. Es ist jedoch bekannt, dass die  $\beta$ -Zellen von Nerven verschiedenster Faserqualitäten innerviert werden. Diese dem vegetativen und sensorischen Nervensystem zuzuordnenden Leitungsbahnen können als mögliche Verbindungen zwischen den Stoffwechselsteuerungszentralen des Gehirns und den Insulin-produzierenden  $\beta$ -Zellen des Pankreas angesehen werden. Über diese neuronalen Strukturen könnte dann möglicherweise das Ausmaß der Insulinausschüttung als Reaktion auf einen bestimmten Blutzuckerwert reguliert werden. Das Resultat wäre ein "Feintuning" der ansonsten nur durch die Menge der in die  $\beta$ -Zellen aufgenommenen Glukose autoregulierten Insulinausschüttung. Gleiches gilt für die Glukagon-produzierenden  $\alpha$ -Zellen des Pankreas, die ebenfalls über eine vegetative Innervation verfügen und durch zentrale Defekte in ihrer endokrinen Funktion beeinflusst werden (Deem *et al.* , 2017).

### 1.2.3 Genetische Einflüsse auf die Genese verschiedener Erkrankungen mit pathologisch verändertem Glukosestoffwechsel

#### Monogenetische und polygenetische Erkrankungen

Allgemein wird bei der Pathogenese des Metabolischen Syndroms und des Diabetes mellitus Typ 2 ein Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition, Umweltfaktoren und Lebensgewohnheiten angenommen. Ausnahmen hiervon sind seltene Formen des Diabetes mellitus Typ 2, die durch monogenetische Mutationen verursacht werden. Ein betroffenes Protein ist der ATP-sensitive Kalium-Kanal ( $K_{ATP}$ ). Diese Mutation führt auch zu Epilepsie und motorischen Entwicklungsstörungen, die höchstwahrscheinlich zentral verursacht werden und nicht von einer Störung der Muskulatur herrühren. Veränderungen des  $K_{ATP}$ -Kanals, der eine Schlüsselposition in der Vermittlung der Glukose-induzierten Insulinausschüttung aus der  $\beta$ -Zelle spielt, sind also auch in den zentralnervösen Strukturen des Gehirns von entscheidender Bedeutung (Ashcroft & Rorsman, 2012).

Eine weitere monogenetische Erkrankung stellt die Mutation des Melanocortin-4-Rezeptor-Gens (MC4R) dar. Die Defizienz des korrespondierenden Proteins führt zu bereits im Kindesalter auftretender ausgeprägter Adipositas und geht mit einem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus Typ 2 einher. Der MC4R ist insbesondere im Hypothalamus exprimiert. Seine Defizienz ist die häufigste Ursache für eine monogenetisch verursachte Fettleibigkeit. (Baumgartner-Parzer, 2018)

Ursächlich für die unterschiedliche Expression der verschiedenen Gene können Mutationen, epigenetische Veränderungen oder regulative Auswirkungen von Signalwegen und Transkriptionsfaktoren sein.

#### Genetische Prädisposition

Neben monogenetischen Erkrankungen, die zu einem gestörten Glukosestoffwechsel führen, gibt es auch Mutationen im Sinne einer genetischen Prädisposition, die bei entsprechenden Umweltverhältnissen die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 begünstigen. Unterschiedlichste Mutationen werden dabei als prädisponierend betrachtet. Fuchsberger *et al.* (2016) identifizierten unterschiedlichste Variationen von Genloci (u.a. TCF7L2, ADCY5, CCND2, EML4, CENPW, IRS1, PPARG, PAX4), die mit Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert sind. Insbesondere auf IRS1 wird im späteren Verlauf dieser Arbeit noch eingegangen. Mahajan *et al.* (2018) identifizierten bei ihren Genom-weiten Analysen weitere Variationen in teilweise bis dato unbeachteten Loci, wie z.B. IRS2. Darüberhinaus gibt es Hinweise, dass Ernährung und BMI der Eltern über epigenetische Prägung zu veränderten Methylierungen von verschiedenen Genen ihrer Kinder führen können und darüber wiederum einen Einfluss auf deren Körpergewicht und Stoffwechsel nehmen (Dunford & Sangster, 2017).

### 1.2.4 Glukose-intrinsische Eigenschaften und deren Rolle bei der Herausbildung von Stoffwechselerkrankungen

Erhöhte Blutglukosespiegel spielen bei der Entwicklung des Metabolischen Syndroms und des Diabetes mellitus Typ 2 eine zentrale Rolle. Sie sind sowohl eine der Ursachen als auch eine Folge der Pathologie, im Sinne eines Teufelskreises. Über längere Zeit erhöhte Glukosekonzentrationen, können Effekte verursachen, die unter dem Oberbegriff Glukotoxizität zusammengefasst werden. Diese reichen von arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen bis hin zum Zelltod von  $\beta$ -Zellen. Zudem führen erhöhte Glukosespiegel zur Glykosylierung von Proteinen, was u.a. bei der diabetischen Mikroangiopathie eine Rolle spielt, wo es zur Glykosylierung des Endothels kommt. Neben diesen Einflüssen auf die verschiedensten Zellen des Körpers, übt Glukose auch einen Einfluss auf die Genexpression von Zellen unterschiedlichster Gewebe aus. Es liegt nahe, dass eine durch Glukose veränderte Genexpression bei der Entstehung und Progredienz des Diabetes mellitus Typ 2 eine Rolle spielt. Bis jetzt ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt, welche Gene oder Genexpressionsnetzwerke, die durch Glukose beeinflusst werden, eine Rolle für die Erkrankung spielen.

## 1.3 Zell- und molekularbiologische Mechanismen

**K<sub>ATP</sub>-Kanäle** Die Insulinsekretion aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas wird unter anderem über ATP-abhängige Kalium-Kanäle an die Blutglukosekonzentration angepasst. Durch erhöhte Blutglukosespiegel kommt es zu vermehrter Aufnahme von Glukose in die  $\beta$ -Zellen des Pankreas und wird dort durch die Glykolyse und den Citratzyklus verstoffwechselt. Dadurch steigen die ATP-Spiegel. Das ATP bindet an die ATP-abhängigen Kalium-Kanäle, die sich daraufhin schließen. Dies führt zu einer Depolarisation der Zellmembran, wodurch die spannungsabhängigen L-Typ Kalzium-Kanäle öffnen. Das einströmende Kalzium wiederum bewirkt die Fusion der Insulin-Vesikel mit der Zellmembran und das gespeicherte Insulin wird exozytiert.

ATP-abhängige Kalium-Kanäle gibt es jedoch nicht nur in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas, sondern auch in Neuronen des Gehirns. Sie führen zu einer Aktivierung der Neurone. Das Gehirn besitzt damit die Fähigkeit, wie die  $\beta$ -Zellen des Pankreas die Blutglukosekonzentration zu "messen" und darauf zu reagieren.

**AMPK** Das bei der Verstoffwechslung der Glukose entstehende ATP wirkt jedoch nicht nur auf die K<sub>ATP</sub>-Kanäle und damit auf das Membranpotenzial, sondern auch auf die AMP-abhängige Kinase, indem sie diese inaktiviert. Die AMPK wiederum wirkt u.a. auf die Transkription des Glukosetransporters 4 und damit auf die Aufnahme von Glukose in die Zelle. Darüberhinaus sind AMPK und ERK-Aktivität, welche im Zusammenhang mit Zellproliferation steht, invers miteinander verbunden.

**Transkriptionsfaktor family max-like protein X** Nicht zu letzt wirkt die Glukose auch auf die Transkription, indem sie, nach Phosphorylierung zu Glukose-6-phosphat die

Translokation des Transkriptionsfaktor family max-like protein X in den Nukleus fördert.

## 1.4 Glukosekonzentrationen im Gehirn

Wie bereits oben beschrieben, ist die Bestimmung der Glukosekonzentration im Blut die gängige Methode, um den Glukosestoffwechsel zu monitoren. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch der Einfluss der Glukose auf Zellen hypothalamischen Ursprungs untersucht werden sollte und es das Ziel war, die Bedingungen in der Zellkultur möglichst denen im Gehirn anzupassen, wurden Konzentrationen verwendet, die den Extrema des interstitiellen Glukosespiegels im Gehirn nahekommen. Gruetter *et al.* (1992) konnten mittels Kernspinresonanzspektroskopie feststellen, dass im menschlichen Gehirn im euglykämischen Zustand Glukosekonzentrationen um die 1 mM und im hyperglykämischen Zustand zwischen 1,8 und 2,7 mM vorliegen. Ferner stehen die Blutglukosekonzentration und die Gehirnglukosekonzentration in einem proportionalen Verhältnis zueinander. Es ist also davon auszugehen, dass sich die beschriebenen Veränderungen der Blutglukosekonzentration über den Tagesverlauf und nach Nahrungsaufnahme auch in veränderten Glukosekonzentrationen im Gehirn widerspiegeln. Ergänzend hierzu stellten Silver & Erecińska (1994) mittels Mikroelektroden fest, dass bei Ratten mit euglykämischen Blutglukosekonzentrationen die Glukosekonzentration im Gehirn  $2,4 \pm 0,1$  mM betrug, während die Gehirnglukosekonzentration bei hypoglykämischen Blutglukosekonzentrationen auf  $0,16 \pm 0,03$  mM absank. Entsprechend wurde für die vorliegende Arbeit als Minimalkonzentration 0,1 mM Glukose, wie man sie sich beim Fasten oder bei extremer körperlicher Anstrengung im Gesunden vorstellen könnte, und als Maximalkonzentration 2,5 mM Glukose gewählt. Um die Zellen an die im Vergleich zum gewöhnlichen Kulturmedium (25 mM Glukose) niedrigen Konzentrationen zu gewöhnen, wurden sie im Vorfeld der Experimente für 24 Stunden bei 0,1 mM Glukose kultiviert. Das beschriebene Stimulationsprotokoll orientiert sich im Wesentlichen an den Vorarbeiten von Breit *et al.* (2016). Ein wesentliches Element dieses Stimulationsprotokolls ist das Hinzugeben von Pyruvat zum Kulturmedium, um eine ausreichende Energieversorgung der Zellen zu gewährleisten.

## 1.5 Zielsetzung und Abgrenzung von Vor- und Vergleichsarbeiten

Breit *et al.* (2016) konnten zeigen, dass unter höheren Glukosekonzentrationen die Phosphorylierung der AMPK abnimmt, während die Aktivität des untersuchten Reportergens CRE zunahm. Aufbauend auf diesen Reportergenstudien, war das Ziel der vorliegenden Arbeit anhand des Modells der hypothalamischen Zelllinie mHypoA-2/10 zu untersuchen, wie Glukose auf die Genexpression hypothalamischer Neurone wirkt. Dabei wurden die Ebenen der Transkription, der Translation und der Funktion mit jeweils geeigneten Methoden untersucht. Vergleichbare Untersuchungen wurden bereits an Zellen anderer Gewebeherkunft, wie z.B. Leber- und Pankreaszellen durchgeführt. Die vorliegende Arbeit präsentiert dage-

gen als erste eine Genom-weite Analyse der Genexpression von mHypoA-2/10-Zellen hypothalamischen Ursprungs unter dem Einfluss unterschiedlicher Glukosekonzentrationen. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zu den Vergleichsarbeiten sind die niedrigen Glukosekonzentrationen (0,1 und 2,5 mM), die sich an den Extrema physiologischer Konzentrationen im Interstitium orientieren und nicht wie in den Vergleichsarbeiten an den gängigen Konzentrationen, mit denen Zellen in der Zellkultur sonst kultiviert werden (25 mM).



# Kapitel 2

## Material und Methoden

Im Zuge dieser Arbeit fanden die folgenden Methoden Anwendung: die Kultivierung eukaryontischer Zellen unter verschiedensten Bedingungen, die Transformation von Bakterien, die Transfektion eukaryontischer Zellen, die Messung von Promotoraktivität mittels Fluoreszenz-basierter Reporter-Gen-Studien, RNA-Sequenzierung (durch externen Dienstleister), Genexpressionsanalyse mittels quantitativer PCR nach vorheriger RNA-Extraktion und reverser Transkription, Proteinnachweis mittels Western-Blot-Analysen, Rho-Aktivitätsmessungen mittels Protein-Präzipitation und Western-Blot-Analysen sowie die Messung der Akkumulation von zyklischem Adenosinmonophosphat mittels radioaktiv markiertem Adenosin und Säulenchromatographie. Im Anschluss wurden die generierten Daten mittels statistischer Analysen ausgewertet.

### 2.1 Material

Die verwendeten Materialien sowie deren Herkunft sind im Folgenden aufgeführt.

#### 2.1.1 Zellen

Tabelle 2.1: **Verwendete Zelllinien**

<b>Zelllinie</b>	<b>Herkunft</b>
mHypoA-2/10	Cedarlane Laboratories Ltd., Toronto
GT1-7	Dr. Weiner (University of California, San Francisco, USA)

**mHypoA-2/10** Die mHypoA-2/10-Zellen von Cedarlane, Toronto sind laut der Produktinformation des Händlers<sup>1</sup> mit Hilfe des CNTF (ciliary neurotrophic factor) und re-

<sup>1</sup><https://www.cedarlanelabs.com/products/detail/clu176?lob=Cellutions> aufgerufen am 11.04.2020.

troviralem Transfer von SV40 T-Ag (simian vacuolating virus 40 large T-Antigene), einem Onkogen, immortalisierte Zellen, die aus einer hypothalamischen Primärkultur zwei Monate alter, männlicher Mäuse (C57Bl/6) gewonnen wurden. (Belsham *et al.*, 2009)

Die mHypoA-2/10-Zelllinie ist die in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchte Zelllinie. Die im weiteren aufgeführte Zelllinie GT1-7 wurde nur in einem kleinen Teil der Experimente untersucht.

**GT1-7** Bei den GT1-7 Zellen handelt es sich um Zellen, die laut Produktinformation des Händlers<sup>2</sup> gewonnen wurden, indem ein Transgen aus der Verbindung der GnRH-Promotorregion und des kodierenden Bereichs des SV40 T-Ag in erwachsene Mäuse eingebracht, der entstehende Tumor des vorderen Hypothalamus reseziert und die extrahierten Zellen geklont wurden. (Mellon *et al.*, 1990)

### 2.1.2 Nährmedien

Für die Kultivierung der Zellen wurde Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) von Thermo Fisher mit 25 mM Glukose, 1 mM Pyruvat, 10 % *fetal calf serum* (FCS) und 1 % Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml) verwendet.

Zum Hungern und zur Stimulation der Zellen wurde Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) von Thermo Fisher ohne Glukose und ohne FCS aber mit 1 mM Pyruvat und 1 % Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml) verwendet. Die gewünschte Glukosekonzentration wurde durch die Zugabe von 45 %-iger Glukoselösung hergestellt.

Die verwendeten Medien sowie deren Zusätze sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: **Verwendete Zellkulturmedien sowie deren Zusätze**

Medium(-bestandteil)	Hersteller
Gibco™DMEM, hoher Glukosegehalt (4,5 g/L = 25 mM)	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Gibco™DMEM, ohne Glucose	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Fetal Calf Serum (FCS)	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Glukose-Lösung 45 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumpyruvat 100 mM	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml; 10.000 µg/ml)	Thermo Fisher (Waltham, USA)

### 2.1.3 Geräte

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

<sup>2</sup><https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/scc116?lang=de&region=DE> aufgerufen am 14.04.2020.

Tabelle 2.3: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Absaugflasche BVC Vario	Vacuubrand GmbH (Wertheim)
Agarosegelelektrophorese-System	Peqlab (Erlangen)
Dowex/Aluminiumoxid-Chromatographie-Säulen	BioRad (München)
Chemilumineszenzsystem (ChemiSmart)	Peqlab (Erlangen)
Fluostar Omega	BMG Labtech GmbH (Offenburg)
Flüssigkeitsszintillationszähler Winspectral 1414	Perkin Elmer (Boston, USA)
Hamilton-Spritze	Hamilton (Höchst)
Lichtmikroskop	Olympus (Hamburg)
Multipette	Eppendorf (Hamburg)
Magnetrührer (Barnstead Thermolyne)	Thermo Fisher (Dreieich)
Neubauer-Zählkammer	Brand (Wertheim)
PCR-Maschine Primus 25 (96 Universal Gradient)	Peqlab (Erlangen)
Photometer (Biophotometer Plus)	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Gilson (Middeltown, USA) Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Pipettierhilfen	Hirschman Laborgeräte (Herrenberg)
RT PCR Instrument	Light-Cycler, Roche (Mannheim)
Protein-Gelelektrophorese-System (Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis)	BioRad (München)
Spannungsquelle (Power Pack EV231)	Peqlab (Erlangen)
Sterilbank HERAsafe KS18	Thermo (Dreieich)
Taumler (Polymax)	Heidolph (Schwabach)
Tiefkühlschrank -80 °C	New Brunswick Scientific, Eppendorf (Hamburg)
Thermoblock (TS-100 ThermoShaker SC20)	Peqlab (Erlangen)
Tray Cell	Hellma (Müllheim)
Ultraschall-Generator	MSE (London)
UV-Transluminator-Foto-Dokumentationssystem	Peqlab (Erlangen)

Vortexer (MS3 basic)	IKA (Staufen)
Waage	Kern (Balingen)
Wasserbad	Memmert (Schwabach)
Zellkultur-Inkubator (HeraCell 240)	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge Thermo Scientific Biofuge Stratos	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge Thermo Scientific Fresco 21	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge Thermo Scientific Pico 17	Heraeus (Hanau)

### 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.4: **Verwendete Verbrauchsmaterialien**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Biospere Filter Tips	Sarstedt (Nümbrecht)
Glasfaser-Filterpapier	Munktell (Bärenstein)
Folie für Western-Blot-Analyse (PE-Schlauchfolie)	Rische+Herfurth (Hamburg)
Messplatte 96 Loch	Greiner (Frickenhausen)
Midi-Säulen	Macherey-Nagel (Düren)
Mikroschraubröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Nitrocellulosemembran (Protran)	Whatmann (Dassel)
Pasteurpipetten	VWR (Darmstadt)
PCR Gefäße	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipetten 5 ml/10 ml/25 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen 10 $\mu$ l/20 $\mu$ l/200 $\mu$ l/1000 $\mu$ l	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagenz -und Zentrifugenröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße 0,5 ml/1,5 ml/2 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
RT-qPCR Folie	Roche (Mannheim)
RT-qPCR Messplatte 96 Loch	Roche (Mannheim)
Szintillationsgefäße	Packard (Groningen, Niederlande)
Zellkultur 12-Loch-Platten	Greiner bio-one (Frickenhausen)

Zellkultur 24-Loch-Platten	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkultur 6-Loch-Platten	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflaschen 175 cm <sup>2</sup>	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturschalen 100 mm	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturschalen 200 mm	Sarstedt (Nümbrecht)

### 2.1.5 Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

Tabelle 2.5: **Verwendete Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
0,05 % Trypsin/EDTA	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
bovines Serum Albumin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthese Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DNA-Größenmarker (Gene Ruler 100bp)	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA-Ladepuffer	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA-Purification-Kit	Macherey-Nagel (Düren)
dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphat)	Fermentas (St. Leon-Rot)
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
EGTA (Ethylenglykoltetraessigsäure)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Fast Start SYBR Green Master	Roche (Mannheim)
Forskolin (FSK)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
HAM's F-12 [+ Glutamin]	Thermo Fisher (Waltham, USA)
HAT-Supplement	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Luminol (3-Aminophthalhydrazid)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Luciferase Assay Reagent	Promega (Madison, USA)
Neurobasal Medium	Thermo Fisher (Waltham, USA)
NucleoBond®Xtra Midi Plasmid	Macherey-Nagel (Düren)
PBS (phosphate buffered saline)	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Poly-Lysin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Poly-L-Ornithin 0,01 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Pluronic F-127 (10 % in H <sub>2</sub> O)	Molecular Probes (Eugene, USA)
Ponceau S Lösung (in 3 % TCA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
PCR Primer	Metabion (Martinsried)
PromoFectin®	PromoKine GmbH (Heidelberg)
Proteinbestimmungs-Kit	BioRad (München)
Protein-Größenmarker (Page Ruler)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Quest Fluo-8™, AM	AAT Bioquest (Sunnyvale, USA)
RNase freies Wasser	Fermentas (St. Leon-Rot)
Rotiblock	Roth (Karlsruhe)
Rotiszint eco plus	Roth (Karlsruhe)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Taq Polymerase Dream Taq	Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq Polymerase Puffer (10x)	Fermentas (St. Leon-Rot)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Roth (Karlsruhe)
Triton-x-100	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
TRIzol® Reagent	Thermo Fisher (Waltham, USA)
β-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)

### 2.1.6 Radioaktive Moleküle

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten radioaktiven Moleküle sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

Tabelle 2.6: **Verwendete radioaktive Moleküle**

<b>Molekül</b>	<b>Hersteller</b>
2,8-[ <sup>3</sup> H]-Adenine	Perkin Elmer (Boston, USA)

### 2.1.7 Antikörper

In Tabelle 2.7 und 2.8 sind die Primär- und Sekundärantikörper aufgelistet, welche im Rahmen dieser Arbeit zur Verwendung kamen.

Tabelle 2.7: **Verwendete Primärantikörper**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Donorspezies</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Histon-H3	Kaninchen	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-IRS1	Kaninchen	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-INSIG1	Kaninchen	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-p-CREB	Kaninchen	Cell Signaling (Danvers, USA)
Anti-p-ERK-1/2	Maus	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Anti-RHO	Kaninchen	Thermo Fisher (Waltham, USA)
Anti-SDHA	Maus	Abcam (Cambridge, UK)

Tabelle 2.8: **Verwendete Sekundärantikörper (Meerrettichperoxidase-konjugiert)**

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Donorspezies</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Maus-IgG	Ziege	BioRad (München)
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	BioRad (München)

### 2.1.8 Primer

Die für die RT-qPCR verwendeten Primer wurden über das “Universal Probe Library Assay Design Center”<sup>3</sup> der Firma Roche designt und dann von metabion international AG (Planegg) synthetisiert. Die Primer-Sequenzen sind in Tabelle 2.9 angegeben.

<sup>3</sup>[https://lifescience.roche.com/en\\_de/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center](https://lifescience.roche.com/en_de/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center) aufgerufen im April 2019. Leider wurde die Dienstleistung am 31. Dezember 2020 eingestellt.

Tabelle 2.9: Primersequenzen

<b>Gen</b>	<b>5'-Primer</b>	<b>3'-Primer</b>
<i>Irs1</i>	ctatgccagcatcagcttcc	ttgctgaggtcatttaggtcttc
<i>Irs2</i>	tgactataccgagatggccttt	gaggtgccacgataggttgt
<i>Igf2r</i>	ccttctctagtggattgtcaagt	agggcgctcaagtcatactc
<i>Igf1r</i>	gagaatttccttcacaattccatc	cacttgcatgacgtctctcc
<i>Insr1</i>	tctttcttcaggaagctacatctg	tgtccaaggcataaaaagaatagtt
<i>Insig1</i>	cagatccagcggaatgtca	ggatacagtaaaccgacaacagc
<i>Insig2</i>	tctatgtccgcttcttggttgc	ttttcagcaataactttgcattc
<i>Socs1_tv1</i>	tctgtctccccatcagc	gcgtgctaccatcctactcg
<i>Socs1_tv2</i>	cagccgacaatgcgatct	cgaagacgaggacgagga
<i>Socs2</i>	cgcgagctcagtcaaaca	agttccttctggagcctctttt
<i>Socs3</i>	atttcgcttcgggactagc	aacttgctgtgggtgaccat
<i>Stat1</i>	tgagatgtcccggatagtgg	cgccagagagaaattcgtgt
<i>Stat2</i>	ggaacagctggaacagtgg	gtagctgccgaaggtgga
<i>Stat3</i>	gttcttggcaccttggatt	caactggcatgtgactctt
<i>Socs4</i>	aatatgcagccgaagctctg	tgcgctgaatctcgaagtaa
<i>Socs5</i>	agcgggaagctgatctttta	cgttctcattacggcttctc
<i>Socs6</i>	tgtgagagtcacatcaatttgttcaag	ataaaactcaggacgccttgc
<i>Stat5a</i>	gagctggtgttccaggtga	ggtggcagtagcattgtgg
<i>Stat5b</i>	gaaacgagctggtctttcaagt	ctggctgccgtgaacaat
<i>Rasa1</i>	gagaaaaattactctatccagttgcac	ggctcgtacacgccttctat
<i>Nras</i>	ttgagacctcagccaagacc	tggcgtatctcccttaccag
<i>Rras</i>	tcacaagctggtggtcgtag	tgggatcatagtgcagacaaaag
<i>Hras</i>	tgccatcaacaacaccaagt	ccattggcacatcatctgaa
<i>Kras</i>	tgtggatgagtatgaccetaag	ccctcattgcactgtactcct
<i>Sos1</i>	tcggcaactcactttacttgaa	tgtccacacacttccaactaatc
<i>Sos2</i>	gacctgcagtcgctctacatt	gaggcgtggaaggacataac
<i>Araf</i>	gaagacaagcccaagatgga	agctgccataggcctcct
<i>Braf</i>	agtcaccacagaaacctatcgtt	acaccacatcttgcgggta

Tabelle 2.9: Primersequenzen

Gen	5'-Primer	3'-Primer
<i>Raf1</i>	ccagagtgcgtgcagtgtt	tccaatctaagcgtgctttct
<i>Srf</i>	ctgacagcagtgggaaac	gctgggtgctgtctggat
<i>Elk3</i>	caccaagtggactgtttctgg	gttgagcagtgtggggaact
<i>Elk4</i>	actctcagcccgtttgctc	gggcatgactgttgagtaca
<i>Elk1</i>	gctccccacataccttga	gggtgcaattggactcaga
<i>Rab20</i>	tgaagcagtggcgttctt	tacaggagagcccagaccat
<i>Rab7b</i>	tcgaggaataccagaccacac	ctctgaccacctgtgtcc
<i>Rab21</i>	tggtggaaaaagagtaaacccttg	cagtgcgtggaatctctcc
<i>Rab5c</i>	ggagaggagcggagtctgt	atgcaaagaggcacttaatgg
<i>Rab15</i>	aaggctgatgaagagcagaaa	tccatgccgtactccttagc
<i>Rab39b</i>	agatcgagccaggaaaacg	tgtagtaggcgcgagtgatg
<i>Rab13</i>	gatccgaaccgtggacatag	gcggtagtattgtcttgaatcg
<i>Rab1a</i>	tgggaaaacaatcaagctacag	tggaagtgattgttcgaaatctt
<i>Rab24</i>	gatgttcaggactatgccgataa	catccacactttggcctgt
<i>Rab2a</i>	tgggaaacagataaaaactccaga	tgaccgtgtgatagaacgaaa
<i>Rab5b</i>	aagccagccctagcattgt	ctgcatatgcctgagcctct
<i>Rabep1</i>	gagcttttccaagcaaaga	acctgttcacgtgactgcat
<i>Rab34</i>	ttgtgggtccaagaaggac	ggcatccttctccattaggg
<i>Rab10os</i>	cttgacaacagcacaccag	tgtataggagggtatcgattca
<i>Rab2b</i>	actgcaaactcgggatacgg	cgtgatgtcatacaccagca
<i>Tbc1d16</i>	cgcagaagcgaaaggaatac	cctctggagtcatggagagc
<i>Tbc1d9b</i>	tacctgaccgtcaaccact	acgtccaccactgtaccac
<i>Tbc1d10a</i>	gattgagcgtgacctgcac	ccttcagcacacggaaca
<i>Tbc1d15</i>	aagaaaccacacaccaatgga	caggaacgaccatttgcttt
<i>Tbc1d7</i>	gggaagctacctcgaagtcc	cgatggcaagaaagacttcat
<i>Tbc1d4</i>	cctctcagtttccttaggattc	ccttgaatataacttcagttccttga
<i>Tbc1d31</i>	cagcaagatcaacgggaaat	ggcagcgatttcttgcattc
<i>Tbc1d22a</i>	tcgtccaatgacatggaaac	ggctggtcttcggtcaac

Tabelle 2.9: Primersequenzen

Gen	5'-Primer	3'-Primer
<i>Tbc1d24</i>	tgggtacagcctaagcaggt	cacagacctccttttgagtgg
<i>Tbc1d23</i>	cttctgccactgtcaacgtc	tctgtctcaagggcttct
<i>Rap2a</i>	accagcagagcttccaagac	gttcccgaccaggatgact
<i>Rap2c</i>	ttgtacaacttggtgtccagtaaa	gtgcaaatttctctgagttgt
<i>Rapgef1</i>	gccaacaagcccagtgaa	tctgtcagagggagctcagg
<i>Rap2b</i>	aagtcaggctggtttaactgcta	agtgacatcactttacatccaacc
<i>Rapgef3</i>	cgacaccacaggttgaa	gagccaaacaggtgcattc
<i>Rapgef2</i>	aaagaaggtgccggtgaag	ttcaaagcttgaggagagttatg
<i>Arhgef4</i>	tgaaaacatcgacaagattgct	gtccgagctcctgacca
<i>Arhgef19</i>	ccaggaggacaaggagatca	gtcctcacacactggacctg
<i>Arhgef2</i>	ctccggaggatcaagacg	ctcaacattcttctgtagcagctc
<i>Arhgef39</i>	aggaaggtcgccctgaat	gccaaagccacgacaaga
<i>Rhou</i>	cctacggccttcgacaact	actcatcctgtcctgcagtg
<i>Rhoa</i>	gaatgacgagcacacgagac	tctgtttgccatatctctgc
<i>Rhob</i>	cagactgcctgacatctget	gtgccacgctaattctcag
<i>Rhoj</i>	aaccagcctcttaccacaa	caaggttttggggatcatctc
<i>Dlc1</i>	ccctcatgacgaacaaact	gctggtccttgggaacatac
<i>Sirt1</i>	cagtgagaaaatgctggccta	ttggtggtacaaacaggtattga
<i>Sirt3</i>	tgctactcattcttgggacctc	gggactgatttctgtactgc
<i>Sirt4</i>	tgatgtccaaaggctggaa	agagttggagcggcattg
<i>Sirt6</i>	gacctgatgctcgctgatg	ggtaccagggtgacagaca
<i>Sirt2</i>	tcaacacctcctgcagaaaa	ctcacacctgggagttgctt
<i>Sirt7</i>	tgatgcaactcctcatgaat	ggtcgccaaggagaagatt
<i>Sirt5</i>	ggccgagtttaacatggaga	ccgggaaaatgaaacctga
<i>Creb1</i>	ggaagagagaggtccgtctaatg	cacatattcttcttcttctacgaca
<i>Crebrf</i>	cggatccagtgctgaac	ctgcttgggtcaccactttt
<i>Creb5</i>	atcatgggatgcaaggt	agcgcagccttcagctc
<i>Creb3l1</i>	tccggagaaagatcaagaataaga	ctccaggctgtccatgtatc

Tabelle 2.9: Primersequenzen

Gen	5'-Primer	3'-Primer
<i>Creb3</i>	ccctcaacccttctctca	cttgccggctttcttgagc
<i>Creb3l2</i>	tccggagaaagatcaagaataaga	ctccaggctgtccatgtattc
<i>Crebl2</i>	tccgagaggaactggaaatg	tgagctctgctgaggcttg
<i>Crebzf</i>	ccgcctcacaacctggta	ctaagcagccgagcatgag
<i>Crebbp</i>	acaagcgaaccaacaaacc	cctgcaccaacagaaccaat
<i>Crtc1</i>	tccgttcctgctctcac	aagagctgggggtgttcata
<i>Crtc3</i>	ttgaccaacagcccatga	ggtggctctgctgtaccaa
<i>Crtc2</i>	agagtctggctggcgaag	gcagacggcagtctaaacaa
<i>Slc2a1</i>	gaccctgcacctcattgg	gatgctcagataggacatccaag
<i>Slc2a8</i>	cagctgatggtgtcactgg	ccagcgcactctaggac
<i>Slc2a6</i>	gcgactcctggagagagaga	tgaaattgccagcacag
<i>Gnao1</i>	ccgccaagacgtgaaat	aagccatcttcatggatgatct
<i>Gnaq</i>	tcttgtggagtcagacaatgaga	ccaggggtaggtgataattggt
<i>Gna12</i>	gataacttggaccggattgg	cttgggtggcctttctagcc
<i>Gnai2</i>	tcaatgactcagccgcttac	gggatgtagtcactctgtgcaa
<i>Gna11</i>	cactggcatcatcgagtacc	gatccacttctgcgctct
<i>Gna13</i>	ggtagccagagtggtcttg	tctctgcagttgggaagttg
<i>Gnai1</i>	acgattcggcagcgactat	tctgctgagttgggatgta
<i>Gnai3</i>	ggagtccattaacaatctgttatcc	tcttcaaactggcactgaatgt
<i>Adcy6</i>	catcgcagactttgacgaga	aggtgctaccgatggtcttg
<i>Adcy1</i>	agatgggacttgacatgatcg	cgcatgttcaggtctacttcag
<i>Adcy3</i>	ggccttagagaagatgcaggta	aagctcagcatcatgacgaa
<i>Leprot</i>	tcttgaaatgtccctctacg	tgccataacccttcaggag
<i>Leprotl1</i>	tcacgttggacttctgtcgt	gccaacagctcagcatcac
<i>Tbp</i>	ggcggtttgctaggttt	tctgggttatcttcacacacca
<i>Sdha</i>	ccctgagcattgcagaatc	tcttctccagcatttgcctta
<i>Actb</i>	ctaaggccaaccgtgaaaag	accagaggcatacagggaca
<i>Rab3b</i>	gtagccgaggtgggaacc	cagtcactgaagccatctcg

Tabelle 2.9: Primersequenzen

Gen	5'-Primer	3'-Primer
<i>S100a10</i>	gtcttcggcactagcctcat	ggcattttgaagagtctgtcg

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultivierung

Die verwendeten Zellen wurden in einer Einzelschicht auf dem Boden von Kulturflaschen kultiviert, die mit 25 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) befüllt waren. Allen Medien wurde Penicillin und Streptomycin beigegeben, um eine Besiedlung der Zellkulturen mit Bakterien zu verhindern. Je nach experimentellem Protokoll wurden Medien mit oder ohne 10 % FCS verwendet. Die Glukosekonzentration variierte je nach experimentellem Protokoll und wurde entweder durch Verdünnung von DMEM mit 25 mM Glukose in DMEM ohne Glukose oder durch Hinzugabe von 2,5 M Glukoselösung zu glukosefreiem DMEM gemäß der gewünschten Zielkonzentration. Die oben genannten, aus Tumorzellen gentechnisch transformierter Mäuse gewonnen Zelllinien bieten den Vorteil einer fast unbegrenzten Teilungsfähigkeit. Zum Erhalt dieser Teilungsfähigkeit ist es notwendig, dass die Zellen in regelmäßigen Abständen aufgeteilt werden, wenn das Zellwachstum 80 bis 90 % der Fläche des Kulturflaschenbodens erreicht hat. Hierzu wurde das Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und der Flaschenboden mit 5 ml  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem *phosphate-buffered saline* (PBS) gewaschen, um der Kultur die Magnesium und Calcium-Ionen zu entziehen, die die Extrazellulärmatrix (EZM) der kultivierten Zellen mit dem Flaschenboden verbinden. Zur Auflösung besagter EZM wurde nach Absaugen des PBS 5 ml Trypsin-EDTA auf die Zellen gegeben und diese für 5 Minuten im Inkubator bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Nach Resuspension der vom Boden gelösten Zellen wurde 1 ml der Suspension mit 24 ml DMEM zur weiteren Kultivierung vermischt und die verbleibenden 4 ml Zellsuspension verworfen oder für die experimentelle Verwendung in speziellen Kulturschalen weiterkultiviert. Die Anzahl der Zellen pro Volumeneinheit wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, damit die gewünschte Anzahl Zellen für die Experimente ausgesät werden konnte.

### 2.2.2 RNA-Sequenzierung

Initial wurden je eine Million mHypoA-2/10-Zellen auf sechs 10 cm Petrischalen ausgesät. Nach 24 Stunden Inkuabion in Medium mit 0,1 mM Glukose und ohne FBS erfolgte ein Mediumwechsel, wobei drei Schalen Medium mit 2,5 mM Glukose beigegeben wurde und drei Schalen Medium ohne Glukose. Nach drei Stunden Inkubation wurden das Medium abgesaugt und 5 ml eiskaltes PBS zugegeben. Die Zellen wurden vom Schalenboden

abgeschabt und je Schale in ein konisches Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation der sechs Proben bei 500 x g und 4 °C für 5 Minuten wurde der zellfreie Überstand verworfen. Es wurden je 200 µl PBS zugegeben und diese zusammen mit den Zellen in sechs Mikroreaktionsgefäße überführt, denen je 800 µl eiskaltes RNAlater® hinzugegeben wurden. Die Mikroreaktionsgefäße wurden sodann in einen Stickstoff-gekühlten Behälter zu IMG M Laboratories GmbH, Bunsenstr. 7a, D-82152 Martinsried transportiert, wo eine totale RNA-Sequenzierung der gewonnenen Proben durchgeführt wurde. IMG M Laboratories verwendete die “Illumina TruSeq® Stranded mRNA technology”<sup>4</sup> und das “NextSeq® 500 next generation sequencing system”<sup>5</sup>.

### 2.2.3 RT-qPCR

Die *Reverse-Transcription quantitative real-time Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) ist eine Methode zur Messung von absoluten und relativen Unterschieden von mRNA-Mengen und dient damit der Analyse von Genexpressionsunterschieden auf Ebene der Transkription. Die RT-qPCR unterteilt sich in zwei Teile: zum einen in die Reverse Transkription, bei der aus der isolierten RNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert wird und zum anderen in die quantitative real-time PCR, bei der mithilfe eines Fluoreszenzstoffes die Menge eines Gen-Transkripts quantifiziert werden kann.

**RNA-Aufreinigung** Zur Validierung und Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung wurde RNA isoliert, um diese später mittels qPCR relativ zu quantifizieren. Dafür wurde, angelehnt an das von Chomczynski und Sacchi beschriebene Verfahren (Chomczynski & Sacchi, 1987, 2006), das in der Arbeitsgruppe etablierte Protokoll angewendet. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Kontamination oder den Abbau von RNA durch ubiquitär vorkommende RNasen zu minimieren, wurden ausschließlich RNase-freie Reaktionsgefäße, Lösungen und Filter-Pipettenspitzen an einem eigens für derartige Kontamination anfällige Arbeiten vorgesehenen Arbeitsplatz verwendet. Zur Vorbereitung der Arbeitsschritte wurde initial eine temperierbare Zentrifuge auf 4 °C vorgekühlt. Dann wurden im ersten Schritt die Überstände von den Kulturschalen abgesaugt und die Zellen mittels eines Milliliters TRIzol® Reagent lysiert. Der Prozess wurde unterstützt durch anfängliches Hoch- und Herunterpipettieren des Lysats. Daraufhin wurden die Kulturschalen samt TRIzol® Reagent für ungefähr fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in ein 1,5-Milliliter-Mikroreaktionsgefäß überführt. Dem Lysat wurden sodann 200 µl Chloroform zugegeben und nach ca. 15 Sekunden Vortexen das entstandene Gemisch für zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei 12.000 Umdrehungen pro Minute und 4 °C

<sup>4</sup><https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/truseq-stranded-mrna.html> aufgerufen am 08. Dezember 2021.

<sup>5</sup><https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/nextseq/order-nextseq-550.html> Website des Nachfolgerprodukts aufgerufen am 08. Dezember 2021.

wurden 300  $\mu\text{l}$  der wässrigen, oberen Phase, welche die RNA enthält (während die chloroformhaltige, untere Phase die DNA und Proteine enthält) abpipettiert und in ein neues 1,5-Milliliter-Mikroreaktionsgefäß überführt. Diesem wurden anschließend 400  $\mu\text{l}$  Isopropanol hinzugefügt, diese Lösung sodann kurz mittels Vortex-Gerät gemischt und schließlich für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der nach 10-minütigem Zentrifugieren bei 21.400 x g und 4 °C entstandene Überstand wurde verworfen, 500  $\mu\text{l}$  kaltes, 70 %-iges, in RNase-freiem Wasser gelöstes Ethanol hinzugegeben und durch fünfmaliges Invertieren des Mikroreaktionsgefäßes gemischt. Sodann wurde die Lösung bei 21.400 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dem Pellet wurde durch Absaugen übriggebliebener Tropfen und Lufttrocknung die restliche Feuchtigkeit entzogen. Schließlich wurde das Pellet in 20  $\mu\text{l}$  IDTE pH 8,0 (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA) mittels Hoch- und Herunterpipettieren sowie Inkubation für zehn Minuten bei 55 °C gelöst. Mittels des *epENDORF BioPhotometers plus* wurde sodann die Konzentration der RNA in der Lösung bestimmt.

**Reverse Transkription** Die Reverse Transkription wurde mithilfe des *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* von *Thermo Scientific* durchgeführt. Alle der folgenden Pipettierschritte wurden auf Eis bzw. auf einem Kühlblock durchgeführt. Im ersten Schritt wurden ca. 1  $\mu\text{g}$  der im Rahmen der oben beschriebenen RNA-Aufreinigung gewonnenen RNA zu einem  $\mu\text{l}$  random hexamer Primer und 12  $\mu\text{l}$  DEPEC- $\text{H}_2\text{O}$  aus dem eben genannten Kit hinzugefügt. Diese Lösung wurde sodann in einem Thermocycler für fünf Minuten bei 65 °C inkubiert und danach wieder auf Eis gestellt und kurz zentrifugiert. Im zweiten Schritt wurden sodann 4  $\mu\text{l}$  des "5x Puffers" zu einem  $\mu\text{l}$  "RNase Inhibitor", 2  $\mu\text{l}$  "10 mM dNTP-Mix" und 1  $\mu\text{l}$  "Revert Aid H-Minus M-MuLV" hinzugegeben, gemischt und kurz zentrifugiert. Schließlich wurden die Mikroreaktionsgefäße im Thermocycler für 10 Minuten bei 25 °C, anschließend für 60 Minuten bei 42 °C und zum Schluss 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Die Proben wurden sodann bei -20 °C eingefroren und gelagert.

**Quantitative real-time PCR** Bei der quantitativen real-time PCR (qPCR) wird eine PCR mit einem Leuchtstoff kombiniert, der mit doppelsträngiger DNA interkaliert, wobei die Leuchtintensität mit der Menge der durch die PCR produzierten DNA korreliert. Zur Quantifizierung werden die PCR-Zyklen gezählt bis eine bestimmte Leuchtintensität erreicht ist, dem sogenannten "Cycle of Quantification", kurz  $C_q$ . Je weniger Zyklen notwendig sind, damit eine Probe diese Leuchtintensität erreicht, also je niedriger der  $C_q$ -Wert ist, desto mehr RNA des untersuchten Gens war in der ursprünglichen Probe. Durch den Vergleich der  $C_q$ -Werte von Ziel-Gen und Referenz-Gen, kann auf das relative Verhältnis der RNA-Menge in untersuchter Probe (z.B. Hochglukose) und Kontrollprobe (z.B. Niedrigglukose) rückgeschlossen werden und so eine relative Induktion oder Repression von Genen bestimmt werden.

Die einzelnen Komponenten der qPCR wurden in eine 96-Well-Platte pipettiert. Alle Pipettierschritte wurden auf Kühlblöcken durchgeführt, die bei -20 °C vorgekühlt wurden. Das für die Verdünnungen verwendete Wasser war RNase frei und bei ca. 8 °C im Kühlschrank vorgekühlt. In jedes Well wurden 8  $\mu\text{l}$  cDNA-Lösung, 2  $\mu\text{l}$  Primer-Lösung und

10 µl SYBR-Green gegeben. Die cDNA wurde 1:200 verdünnt, indem pro Well 0,1 µl der ursprünglichen cDNA-Lösung zu 7,9 µl Wasser hinzugegeben wurden. Die Primer wurden 1:100 von 50 µM auf 500 µM verdünnt, indem pro Well 0,2 µl des vorwärts-Primers und 0,2 µl des rückwärts-Primers zu 1,6 µl Wasser hinzugegeben wurden. Die Lösungen wurden für die Anzahl der verwendeten Wells vorbereitet und dann auf die einzelnen Wells verteilt. Nach dem Pipettieren wurde die Well-Platte mit einer Folie überzogen und auf einem Rüttler kurz gerüttelt und anschließend für einige Sekunden bei 600 bis 1000 Umdrehungen pro Minute und Raumtemperatur zentrifugiert. Sodann wurde die Lichtintensität in Abhängigkeit von der PCR-Zyklusanzahl in einem LightCycler 480 der Firma Roche nach folgenden Einstellungen gemessen: nach 3 Minuten Vorinkubation bei 95 °C folgten 45 Zyklen mit 15 Sekunden bei 95 °C, gefolgt von 15 Sekunden bei 55 °C und anschließenden 30 Sekunden bei 72 °C. Nach den 45 Zyklen wurde die Schmelzkurve für 10 Sekunden bei 95 °C, gefolgt von einer Minute bei 60 °C, gemessen. Abschließend wurde in der Abkühlungsphase die Temperatur für 30 Sekunden auf 40 °C gesenkt.

Bei der Durchführung und Präsentation der Ergebnisse der quantitativen real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) wurde sich an den MIQE-Richtlinien (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) orientiert. (Bustin *et al.*, 2009)

### 2.2.4 Western-Blot

**Probenvorbereitung** Die für die Proteinbestimmung vorgesehenen Zellen wurden auf 6-Well-Platten kultiviert und nach Stimulation bzw. Behandlung, in der für das jeweilige Experiment vorgesehenen Art, auf folgende Weise geerntet: Die Kulturplatte wurde auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und je Well 300 µl SDS-Lösung (Laemmli-Puffer) darauf gegeben. Danach wurden die Platten entweder bei -20 °C eingefroren oder die Lysate direkt gewonnen und weiter verarbeitet. Dazu wurden die (aufgetauten) Lysate in 1,5-ml-Mikroreaktionsgefäße überführt und hiernach für mindestens 15 Sekunden mit dem Ultraschallgerät behandelt, bis sich weißlicher Schaum bildete. Anschließend wurden die Lysate fünf Minuten bei 65 °C inkubiert und für weitere fünf Minuten bei 6.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

**Gelelektrophorese** Während der Probenvorbereitung wurden die Gele für die Elektrophorese vorbereitet. Die Gele wurden vor Ort mit Hilfe des FastCast-Systems von Bio-Rad gegossen. Dazu wurden die Glasformen vorher mit Methanol gereinigt und in die Vorrichtung eingespannt. Das Trenngel (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.10) wurde zuerst in die Glasform gegossen, mit 300-400 µl Übersichtungspuffer abgedeckt und ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde der Übersichtungspuffer abgegossen und mit Wasser nachgespült. Die verbleibende Flüssigkeit wurde mit Filterpapier abgesaugt. Sodann wurde das Sammelgel (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.10) auf das Trenngel gegeben und mit einem Kamm versehen, um Aussparungen, auch als Taschen bezeichnet, für das Auftragen der Proben zu schaffen. Nach ca. 5 Minuten, sobald das Sammelgel sich verfestigt hatte, wurden die Kämmen entfernt und die entstandenen Taschen mit Wasser

ausgespült. Sodann wurden die Gele samt Glasform aus dem Spanngestell herausgenommen und in SDS-Puffer gestellt. Die Taschen wurden mit je 20 µl Lysat bzw. 4 µl des Komigrationsstandards beladen. Die Elektrophorese wurde mit 80 V begonnen und nach ca. 15-20 Minuten, sobald die Probe das Trenngel erreicht hatte, bei 120 V fortgeführt, bis die Banden des Markers sich auf die gewünschte Höhe aufgetrennt hatten.

**Proteintransfer** Der Proteintransfer, das eigentliche Blotting im Sinne eines Western Blots, wurde mit dem "Wet Transfer"-Verfahren von Bio-Rad<sup>6</sup> wie folgt durchgeführt: Nach Ende der Gelelektrophorese wurde das Trenngel vom Sammelgel abgelöst und in SDS-Puffer eingelegt. Sodann wurde es zwischen Filterpapieren auf einer Membran aufgeschichtet und in eine von Schaumpolstern ausgekleidete Presse geklemmt. Dabei wurde darauf geachtet, dass alles gut von oben genanntem Puffer durchtränkt war und keine Luftbläschen zwischen den einzelnen Schichten aus Membran, Gel und Filterpapieren verblieben. Die eingespannten Gele wurden dann in den mit SDS-Puffer aufgefüllten Blotting-Behältern montiert. Die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte mit 350 mA über 2 Stunden in einem Kühlraum bei ca. 8 °C.

**Immundetektion** Der Erfolg des Proteintransfers wurde nach Auseinanderbauen der Blotting-Vorrichtung durch eine Färbung der Membran mit dem Aminosäuren-bindenden Farbstoff Ponceau-S kontrolliert. Mit vollentsalztem Wasser wurde die Membran sodann vom Ponceau S entfärbt, beschriftet und nach Bedarf in ca. 2,5 cm breite Streifen geschnitten. Die zugeschnittenen Membranen wurden sodann zweimal für 5 Minuten in TBST (tris-buffered-saline mit Tween 20) gewaschen. Anschließend wurden die Membranen für 30 Minuten in 5 %-igem Milchpulver/TBST blockiert. Beim Blockieren binden die Proteine des Milchpulvers, welche von den in den folgenden Schritten verwendeten Antikörpern nicht erkannt werden, die freien Stellen der Membran. Dies verhindert, dass Fremdproteine sich an die Membran anheften können und so zu Fehlern führen. Nach abgießen des Milchpulvers wurde der ebenfalls in Milchpulver gelöste Erstantikörper auf die Membranen gegeben und über Nacht im Kühlraum bei ca. 8 °C auf einer Wippe inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Membranen sodann dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen und anschließend in der Zweitantikörperlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgten wieder drei zehnminütige Waschschrte mit TBST. Anschließend wurden zwei Substrate auf die Membranen gegeben, diese darin eine Minute inkubiert und schließlich die Chemilumineszenz im Chemismart gemessen. Dieser liefert ein Schwarz-Weiß-Bild der bestimmten Proteinbanden. Für die densitometrische Quantifizierung der Proteinbanden wurde das Programm ImageJ verwendet, welches eine Verteilungskurve der Farbintensität in einem rechteckigen Bereich erstellt, dessen Grenzen vom Benutzer individuell bestimmt werden können. Die Fläche unter der Kurve kann als Absolutwert ohne Einheit zur relativen Quantifizierung der Proteinmenge herangezogen werden.

---

<sup>6</sup><https://www.bio-rad.com/de-de/product/mini-trans-blot-cell?ID=589ca8f7-5751-487a-a453-571ee8cc8b7e> aufgerufen am 03.09.2023.

Tabelle 2.10: **Western Blot**

Zusammensetzung der beim Western Blot verwendeten Puffer und Gele.

<b>Laemmli-Puffer</b>	
0,025 %	Bromphenolblau
5 %	Glycerin
1 %	SDS (sodium dodecyl sulfate, Natriumlaurylsulfat)
15 mM	TRIS/HCL pH 6,8
1,25 %	$\beta$ -Mercaptoethanol
<b>10x SDS-Puffer</b>	
25 mM	TRIS/HCL
0,1 %	SDS
190 mM	Glycin
<b>Sammelgel pH 6,8</b>	
0,13 M	TRIS
0,1 %	SDS
5,4 %	Acrylamid
0,14 %	Bisacrylamid
0,001 %	TEMED (Tetramethylethyldiamin)
0,001 %	Ammoniumpersulfat
<b>Trenngel pH 8,8</b>	
0,38 M	TRIS
0,1 %	SDS
10 %	Acrylamid
0,3 %	Bisacrylamid
0,001 %	TEMED
0,001 %	Ammoniumpersulfat

### 2.2.5 Bestimmung der RHO-Aktivität

Rho ist ein GTPase-Protein, das in seiner aktiven Form GTP und in seiner inaktiven Form GDP gebunden hat. Mittels Hydrolyse des GTP zu GDP wechselt Rho von seiner aktiven Form in seine inaktive Form. Mit Hilfe des Rho-Assays wurde aktives Rho aus Zelllysaten isoliert und mittels Western Blot detektiert.

Für Versuche, bei denen der Rho-Assay Anwendung fand, wurden 1,5 Millionen Zellen pro 10 cm Kulturschale ausgesät. Die nachfolgenden Schritte entsprechen im Wesentlichen bis auf einige Ergänzungen und Abänderungen den Anweisungen im "User Guide: Active Rho Pull-Down and Detection Kit" von Thermo Fisher Scientific<sup>7</sup>. Nach Stimulation der Zellen wurden diese auf Eis gestellt, das Kulturmedium abgesaugt und die Schale mit 1 ml eiskaltem TBS (Tris buffered saline) beträufelt. Nach Absaugung des TBS, wurden 500 µl eiskalter, sogenannter Lysis/Binding/Wash-Buffer hinzugegeben, um die Zellen zu lysieren. Mit Hilfe eines Cell Scrapers wurden die lysierten Zellen vom Boden der 10 cm Schale abgelöst. Das gesamte Lysat wurde anschließend in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und für ca. 5 Sekunden gevortext. Nach einer Inkubation auf Eis für 5 Minuten, wurden die Proben bei 16.000 x g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde das Glutathion-Harz vorbereitet und für ca. eine Minute geschüttelt um eine vollständige Auflösung der Agarose zu erreichen. Je Probe wurde ein sogenannter Spin Cup in ein spezielles Sammelröhrchen eingesetzt und 100 µl des Glutathion-Harzes in das Sammelröhrchen gegeben. Das Sammelröhrchen samt Glutathion-Harz enthaltendem Spin Cup wurde nun bei 6.000 x g und Raumtemperatur für ca. 20 Sekunden zentrifugiert, um das Harz am Boden des Spin Cups zu konzentrieren. Der Durchfluss wurde verworfen und 400 µl des Lysis/Binding/Wash-Puffers wurden in das Sammelröhrchen gegeben. Nach fünfmaligem Invertieren der Röhrchen, wurden die Mikroreaktionsgefäße samt Sammelröhrchen abermals bei 6.000 x g und Raumtemperatur für 20 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die bei -70 °C eingefrorenen GST-Rhotekin-RBD-Aliquots wurden auf Eis aufgetaut und 72 µl, das entspricht 400 µg GST-Rhotekin-RBD, wurden in den Spin Cup mit dem Glutathion-Harz gegeben. Gleich im Anschluss daran wurden bis zu 500 µl Zelllysate hinzugegeben, die Probe für ca. 10 Sekunden gevortext und dann für ca. eine Stunde im Kühlraum auf einer Wippe inkubiert. Während der Inkubation kam es gemäß zu Grunde liegender Theorie zur Bindung des aktiven, GTP-gebundenen Rhos an das Glutathion-Harz, vermittelt durch das GST-Rhotekin-Bindeprotein (s. Step 1 auf Abbildung 2.1). Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Spin Cup zusammen mit dem Sammelröhrchen bei 6.000 x g für ca. 20 Sekunden zentrifugiert. Der Spin Cup wurde in ein neues Sammelröhrchen gestellt und das Harz dreimal gewaschen, indem 400 µl Lysis/Binding/Wash-Puffer in den Spin Cup gegeben wurden, dreimal invertiert wurde, dieses zusammen mit dem Sammelröhrchen bei 6.000 x g für ca. 20 Sekunden zentrifugiert wurde und der Durchfluss verworfen wurde. Dadurch wurden die ungebundenen Proteine entfernt, während das gebundene, aktive Rho im Harz des Spin Cups verblieb (s. Step 2 auf Abbildung 2.1). Nach diesem Schritt wurde der Spin Cup abermals in ein neues Sammelröhrchen gestellt. Währenddessen wurde ein Puffer aus einem Teil  $\beta$ -Mercaptoethanol

<sup>7</sup><https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/16116#/16116> aufgerufen am 12.06.2020.

und 20 Teilen 2X SDS Probenpuffer hergestellt. Davon wurden 50  $\mu\text{l}$  auf den Spin Cup gegeben und dieser nach ca. 10 Sekunden Vortexen für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde mittels Zentrifugation bei 6.000 x g für zwei Minuten das mit dem Bindeprotein verbundene GTP-gebundene Rho zusammen mit dem SDS Puffer in das Sammelröhrchen überführt (s. Step 3 auf Abbildung 2.1). Bevor die Proben bis zur Verwendung im Rahmen der Western Blot Analyse bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurden, wurden sie für 5 Minuten bei 95 bis  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert (Für Einzelheiten der Western Blot Analyse s.o.).

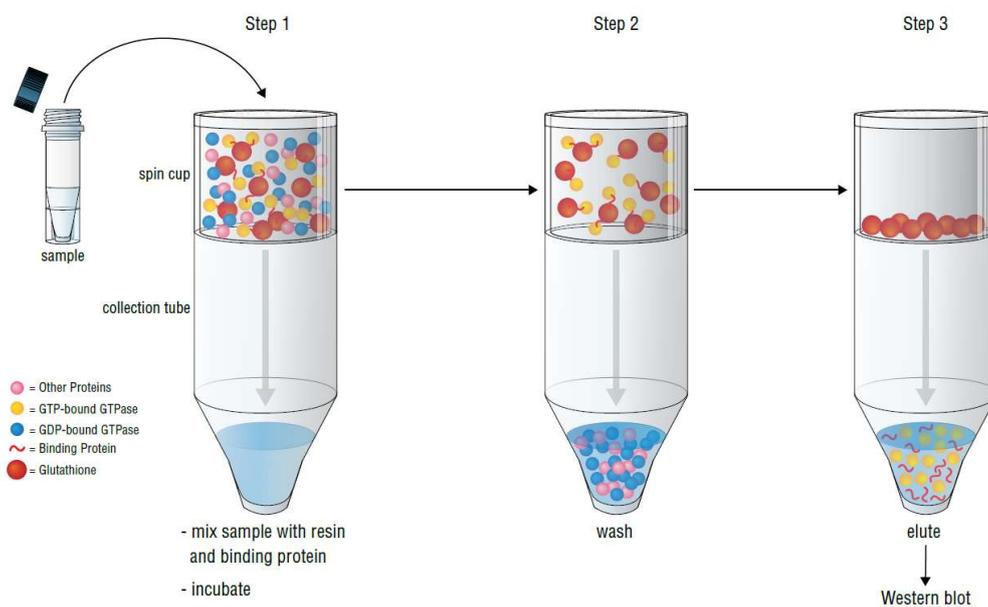


Abbildung 2.1: **Rho-Assay**

Graphische Darstellung der wesentlichen Schritte des Rho-Assays aus dem Data Sheet von Cell Signaling Technology (Figure 2). Illustration reproduced courtesy of Cell Signaling Technology, Inc. ([www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com)). <https://www.cellsignal.de/products/cellular-assay-kits/active-rho-detection-kit/8820> aufgerufen am 12.06.2020.

### 2.2.6 Messung der cAMP-Akkumulation

Mit Hilfe des cAMP-Akkumulations-Assays kann die Akkumulation von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) gemessen werden. Klassischerweise wird cAMP nach Aktivierung durch  $G_{\alpha s}$ -Proteine von der Adenylatzyklase gebildet. Einer der Haupteffekte von cAMP wiederum ist die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) durch allosterische Bindung von

cAMP an die PKA und resultierender Konformationsänderung. Die Proteinkinase A selbst ist involviert in die Regulation der Aktivität von Schlüsselenzymen des Intermediärstoffwechsels, der Hormonbiosynthese, der Aktivität von Ionenkanälen und der Transkription cAMP-abhängiger Gene. Daneben gibt es noch PKA-unabhängige Wirkungen von cAMP z.B. die Regulation der Offenwahrscheinlichkeit von einigen cyclic nucleotide-gated Ionenkanälen (Netzker & Deutzmann, 2022a).

Für den cAMP-Accumulations-Assay wurden 50.000 bis 100.000 Zellen pro Well einer 12-Well-Platte ausgesät. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, erfolgte am nächsten Tag ein Mediumwechsel. Dabei wurden die Zellen mit <sup>3</sup>H-Adenin markiert, indem <sup>3</sup>H-Adenin aus einer 1 mCi Stammlösung in Serum-freiem Medium auf 1 µCi verdünnt wurde und hiervon je 500 µl pro Well auf die Zellen gegeben wurden. Nach diesem Schritt wurden die Zellen wiederum über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Gemäß der zugrunde liegenden Überlegung verstoffwechselten die Zellen unterdessen das mit dem radioaktiven Tritium markierte Adenin zu Adenintriphosphat, dem Substrat der Adenylatzyklase zur Produktion von cAMP. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Stimulation der Zellen durch einen weiteren Mediumwechsel. Hierbei wurde zum einen 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES), unter Verwendung einer 1 M Stammlösung, in Serum-freiem Medium auf 25 mM verdünnt, um eine pH-Veränderung während der Stimulation außerhalb der CO<sub>2</sub>-Atmosphäre zu verhindern. Zum anderen wurde dem Serum-freien Medium 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) aus einer 100 mM Stammlösung beigegeben bis eine finale Konzentration von 1 mM erreicht worden war. IBMX ist ein Inhibitor der Phosphodiesterasen und verhindert den Abbau von cAMP. Hierdurch wird die Messung der Akkumulation erst ermöglicht. Weitere Wirkstoffe, die dem Stimulations-Medium hinzugefügt wurden, sind mit Ihren Konzentrationen Tabelle 2.11 zu entnehmen. Während die Zellen durch die Inkubation in den eben beschriebenen Medien stimuliert wurden, wurden die für die Chromatographie verwendeten Säulen vorbereitet. Die Dowex-Harz-Säulen wurden mit je 10 ml einer 1 M Salzsäurelösung und danach mit 10 ml Wasser gewaschen. Die Aluminiumoxid-Säulen wurden mit 10 ml Imidazolpuffer (0,1 mM Imidazol, pH 7,4) gewaschen. Nach Ende der Stimulationszeit wurden die Zellen auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und je Well 1 ml eiskalte, 5 %-ige Trichloressigsäure (TCA) dazugegeben. Nachdem die Zellen 15 Minuten auf Eis in TCA inkubiert worden waren, wurden die Zelllysate samt TCA auf die Dowex-Harz-Säulen übertragen. Hiernach wurden die Säulen mit 4 ml Wasser gewaschen und die abfließende Flüssigkeit zur Bestimmung des Gesamt-ATP in Szintillationsröhrchen aufgefangen. Dann wurden die Dowex-Harz-Säulen über den Aluminiumoxid-Säulen positioniert und mit weiteren 10 ml Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Aluminiumoxid-Säulen mit 1 ml Imidazol gewaschen und danach auf eine neue Reihe Szintillationsröhrchen gestellt, um im nächsten Schritt durch Zugabe von 5 ml Imidazol das cAMP zu eluieren. Den Szintillationsröhrchen wurde je 10 ml Szintillationsflüssigkeit hinzugegeben und der Inhalt durch Schütteln gemischt. Die vom Tritium ausgehende Strahlung reicht nicht aus, um vom Szintillationszähler detektiert werden zu können. Deshalb wird den Elutionen eine sogenannte Szintillationsflüssigkeit zugegeben, die durch die Strahlung des Tritiums ihrerseits zum radioaktiven Zerfall angeregt wird, was vom Szintillationszähler dann gemessen werden kann. Diese von den Szintillationsröhrchen

ausgehende Radioaktivität wurde schließlich im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

Tabelle 2.11: **cAMP-Assay**

Im Rahmen des cAMP-Akkumulations-Assays verwendete Wirkstoffe und deren Konzentrationen.

Wirkstoff	Stammlösung	finale Konzentration	Verdünnung
Noradrenalin	10 mM	10 $\mu$ M	1 : 1.000
NPY	100 $\mu$ M	100 nM	1 : 1.000
Forskolin	5 mM	5 $\mu$ M	1 : 1.000
$\alpha$ -MSH	1 mM	1 $\mu$ M	1 : 1.000

### 2.2.7 Statistische Methoden

Die im Zuge dieser Arbeit erhobenen Rohdaten wurden in das Computerprogramm Microsoft Excel übertragen und dort weiter analysiert. Die statistische Auswertung und die Erstellung der Diagramme erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme GraphPad Prism 8 und R<sup>8</sup>. Dargestellt ist immer der arithmetische Mittelwert zusammen mit dem zugehörigen Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Signifikante Unterschiede zwischen Bedingungen sind mit Sternchen kenntlich gemacht (\* für  $p < 0,05$ ; \*\* für  $p < 0,01$ ; \*\*\* für  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* für  $p < 0,0001$ ).

<sup>8</sup>R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.



# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Bestimmung der Stimulationszeit

Um abzuschätzen, wann der Effekt der Glukose auf die Genexpression am stärksten zu beobachten wäre, wurde zu Beginn der Experimente eine Testreihe durchgeführt, bei der nach unterschiedlichen Inkubationszeiten unter hohen und niedrigen Glukosekonzentrationen die CRE-Aktivität mittels Reporter-Assay gemessen wurde. Breit *et al.* (2016) hatten in Vorarbeiten mit dieser Methode bereits einen Einfluss der Glukose auf die CRE-Aktivität nachweisen können. Deshalb erschien dieses Vorgehen als geeignet, um die optimale Stimulations- bzw. Inkubationszeit für die geplanten Experimente zu bestimmen. Die Reporteraktivität zeigte sich zwischen zwei und vier Stunden am stärksten erhöht, sodass entschieden wurde, bei den folgenden Experimenten, die Effekte der Glukosebehandlung nach drei Stunden zu untersuchen.

### 3.2 RNA-Sequenzierung: Differenzierte Beeinflussung des Transkriptoms durch Glukose

Auf Grundlage der Reporter-Analysen wurden mHypoA-2/10-Zellen nach 24 Stunden Inkubation in Medium mit 0,1 mM Glucose und ohne FBS für drei Stunden mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen behandelt. Die eine Gruppe wurde während der drei Stunden in Medium ohne Glukose inkubiert, die andere Gruppe in Medium mit 2,5 mM Glukose. Danach wurden die Proben kryokonserviert und zu IMGGM Laboratories GmbH geschickt, wo eine totale RNA-Sequenzierung durchgeführt wurde. Die folgenden Aussagen betreffend die RNA-Sequenzierung gründen sich auf den von IMGGM Laboratories GmbH erstellten Bericht.

#### 3.2.1 Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle stellt einen wichtigen Schritt vor der Weiterverarbeitung, Analyse und Interpretation der mit Hilfe des RNA-Sequenzierungs-Verfahrens gewonnenen Daten dar.

Erst wenn eine ausreichende Qualität festgestellt ist, ergeben die weitere Verarbeitung, Analyse und Interpretation der Daten Sinn. Bei mangelnder Qualität der Rohdaten würde es sonst zu falschen Ergebnissen in den folgenden Schritten kommen.

Neben der Kontrolle der Qualität der gemessenen Basensequenzen ist es zuerst wichtig, die Proben auf deren Reinheit und RNA-Gehalt zu untersuchen, um zu gewährleisten, dass in jeder Probe genügend RNA vorhanden ist und es nicht zu Verunreinigungen gekommen ist. Konzentration und Reinheit der RNA wurden mittels Spektralphotometrie (NanoDrop ND-1000, Peqlab) bestimmt. Hierbei zeigt ein Verhältnis von  $A_{260}/A_{280} \geq 1,9$  an, dass die Probe nicht mit Proteinen kontaminiert ist. Ein Verhältnis von  $A_{260}/A_{230} \geq 2$  zeigt zusätzlich an, dass die Probe nicht durch organische Verbindungen (z.B. Alkohol, Phenol, Kohlenhydrate etc.) kontaminiert ist. Außerdem wurde die Integrität der RNA mittels Kapillarelektrophorese (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies) bestimmt. Aus dem elektrophoretischen Profil kann dann ein RNA-Qualitätsindex (RIN) errechnet werden. Der RIN sollte mindestens 7,5 betragen. Ein RIN von 10 steht für exzellente RNA-Qualität. In Tabelle 3.1 sind die ermittelten RNA-Konzentrationen, sowie die dazugehörigen Indizes für Reinheit und Integrität der einzelnen Proben dargestellt. Wie zu erkennen ist, erfüllen alle Proben die erforderlichen Grenzwerte der Qualitätsindizes.

Tabelle 3.1: **RNA-Konzentrationen und Qualitätsindizes**

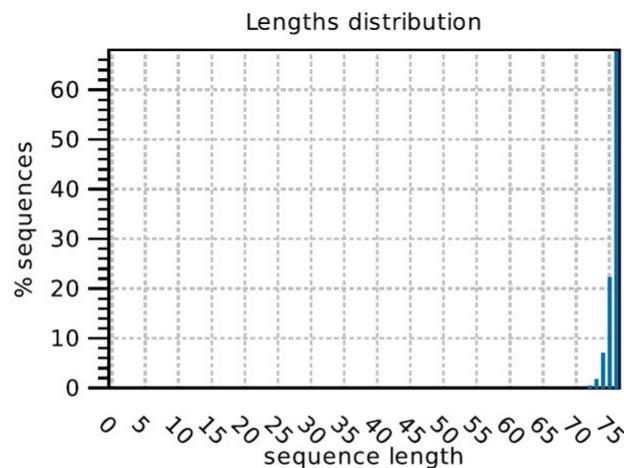
RNA-Konzentrationen, Reinheit ( $A_{260}/A_{280}$ ;  $A_{260}/A_{230}$ ) und Integrität (RIN) der jeweiligen Proben.

Probe	Bedingung	RNA-Konzentration	A260/A280	A260/A230	RIN
1	basal	140,79 ng/µl	2,12	2,20	9,6
2	basal	128,01 ng/µl	2,09	2,16	9,6
3	basal	113,11 ng/µl	2,05	2,16	9,4
4	Glukose	134,74 ng/µl	2,12	2,17	9,7
5	Glukose	127,15 ng/µl	2,07	2,15	9,1
6	Glukose	190,37 ng/µl	2,07	2,18	9,7

Zur Durchführung der Qualitätskontrolle stehen außerdem verschiedene statistische Verfahren zur Verfügung, die jeweils einzeln und in Ihrer Gesamtschau eine Bewertung der Qualität erlauben. Im Folgenden werden die einzelnen Methoden der Qualitätskontrolle sowie deren Ergebnisse in Bezug auf die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Daten vorgestellt. Die Analyse erfolgt dabei sowohl auf Ebene der Sequenzen als auch auf Ebene der Basen innerhalb der Sequenzen. Die folgenden Methoden finden also Anwendung in zwei unterschiedlichen Dimensionen.

Insgesamt wurden 95.095.416 Sequenzen und 7.177.245.043 Nukleotide gemessen. Die Analysen wurden mit der CLC Genomics Workbench 12.0 durchgeführt.

**Längenverteilung** Im ersten Schritt wurden die Verteilung der Längen der gemessenen Sequenzen in Basenpaaren (bp) bestimmt. Der größte Teil der Sequenzen wies eine Länge von über 70 Basenpaaren auf. Je nach Zielstellung des jeweiligen Experiments gilt es unterschiedliche Sequenzlängen anzustreben. Der Hersteller des verwendeten Verfahrens, Illumina, Inc., empfiehlt für die Genexpressionsanalyse eine Sequenzlänge von 50 bis 75 bp.<sup>1</sup> Die erreichten Sequenzlängen waren also gemäß den Herstellerangaben genau richtig für die in dieser Arbeit angestrebte Genexpressionsanalyse.



Distribution of sequence lengths. In cases of untrimmed Illumina reads it will just contain a single peak.  
 x: sequence length in base-pairs  
 y: number of sequences featuring a particular length normalized to the total number of sequences

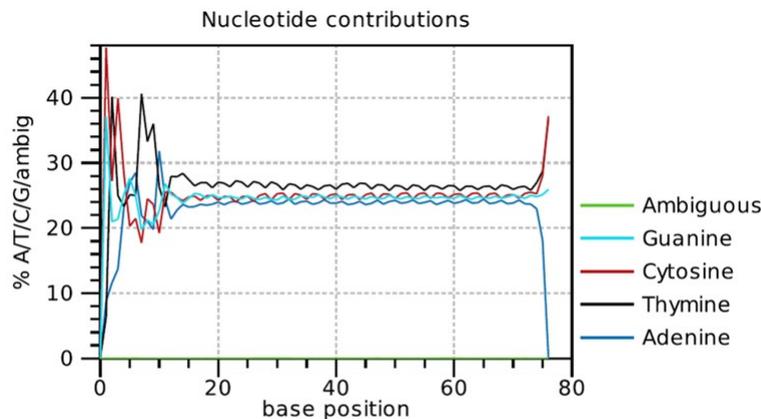
**Abbildung 3.1: Verteilung der Sequenzlängen**

Darstellung der relativen Häufigkeitsverteilung der Sequenzlängen im Vergleich zur Gesamtanzahl aller Sequenzen. Abbildung entnommen aus dem *Sequencing QC Report* von IMGM Laboratories (Planegg).

**Basen-Anteile** Bei einer zufälligen Verteilung der vier Basen Guanin, Cytosin, Thymin und Adenin sollte theoretisch jede Base mit einer Wahrscheinlichkeit von 25% auftreten. In Abbildung 3.2 ist der Anteil der Basen in Abhängigkeit von ihrer Basenposition dargestellt. Das ausgeprägte Rauschen zu Beginn der Sequenz (Basenposition 1 bis 15) ist dem Verfahren geschuldet und kein Indikator für einen Qualitätsmangel. Viel interessanter

<sup>1</sup><https://support.illumina.com/bulletins/2017/04/considerations-for-rna-seq-read-length-and-coverage-.html> aufgerufen am 16.03.2022.

ist der folgende Hauptteil der Sequenz. Es ist zu erkennen, dass die einzelnen Basen alle mit einer ähnlichen Wahrscheinlichkeit um die 25% auftreten, wie man es nach der oben genannten Theorie erwarten würde.



Coverages for the four DNA nucleotides and ambiguous bases.

x: base position

y: number of nucleotides observed per type normalized to the total number of nucleotides observed at that position

### Abbildung 3.2: Verteilung der Basen je Basenposition

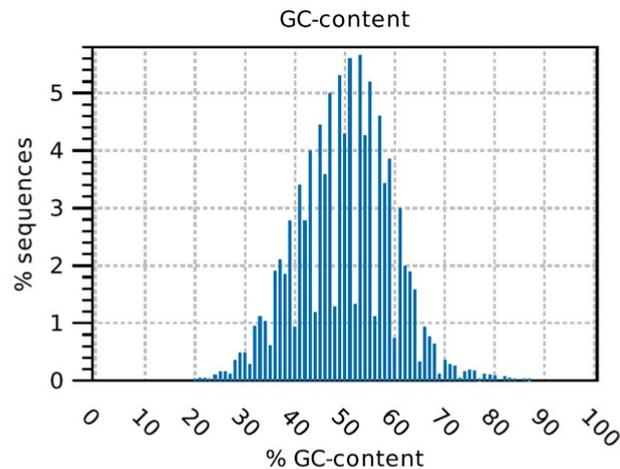
Dargestellt ist der prozentuale Anteil der vier Basen Guanin, Cytosin, Thymin und Adenin sowie der uneindeutig bestimmten Basen in Abhängigkeit von ihrer Basenposition. Abbildung entnommen aus dem *Sequencing QC Report* von IMG/M Laboratories (Planegg).

**GC-Anteil** Der GC-Anteil gibt an, wie viel Prozent der gemessenen Basenpaare aus Guanin-Cytosin-Basenpaaren bestehen. Der GC-Anteil sollte Normalverteilt und der Verteilung des untersuchten Genoms entsprechen. Ein nicht normalverteilter GC-Anteil könnte z.B. für eine Kontamination sprechen.<sup>2</sup> Laut NBCI beläuft sich der mediane GC-Anteil auf 42.0913 %.<sup>3</sup> Wie in Abbildung 3.3 dargestellt, war in der vorliegenden Untersuchung die Häufigkeit der GC-Anteile normalverteilt. Allerdings lag der mediane GC-Anteil bei etwas über 50 % und damit um ca. 10 %-Punkte deutlich höher als das Referenzgenom. Dies lässt auf einen leichten systematischen Fehler schließen. Angesichts der insgesamt sehr

<sup>2</sup><https://training.galaxyproject.org/training-material/topics/sequence-analysis/tutorials/quality-control/tutorial.html> aufgerufen am 16.03.2022.

<sup>3</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=GRCm38.p4> aufgerufen am 17.03.2022.

guten Qualitätsparameter ist jedoch von keiner erheblichen Verfälschung der Ergebnisse auszugehen. Außerdem wurde der GC-Anteil in Abhängigkeit von der Basenposition bestimmt (Abbildung 3.4). Die meisten Basenpositionen weisen hier einen GC-Anteil von ca. 44 % auf. Dies passt zum Referenzgenom und legt eine angemessene Qualität der Messung nahe.



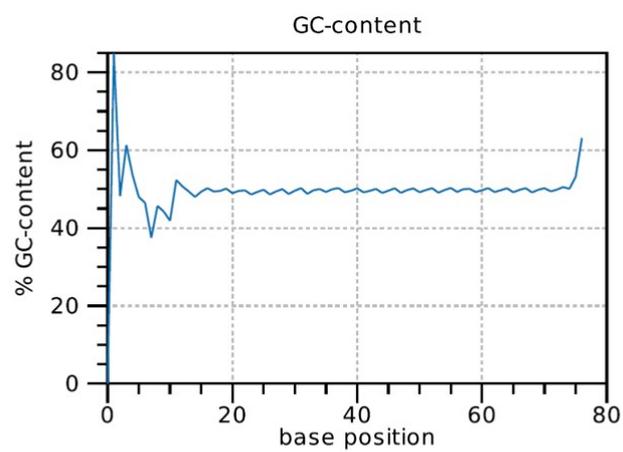
Distribution of GC-contents. The GC-content of a sequence is calculated as the number of GC-bases compared to all bases (including ambiguous bases).  
 x: relative GC-content of a sequence in percent  
 y: number of sequences featuring particular GC-percentages normalized to the total number of sequences

#### Abbildung 3.3: Verteilung der GC-Anteile der Sequenzen

Darstellung der relativen Häufigkeitsverteilung von Sequenzen mit bestimmten prozentualen Anteilen von Guanin-Cytosin-Basenpaaren. Abbildung entnommen aus dem *Sequencing QC Report* von IMG Laboratory (Planegg).

**Anteil uneindeutiger Basen** Ein weiterer Aspekt der Qualitätskontrolle stellt die Bestimmung des Anteils an Basen dar, die beim Messprozess nicht eindeutig bestimmt werden konnten und deshalb mit "N" (für Englisch "any") gekennzeichnet wurden. Wie in den Abbildungen 3.5 und 3.6 zu sehen ist, war der Anteil an Basen, die nicht eindeutig bestimmt werden konnten, äußerst gering. Es kann somit von einer hohen Qualität der bestimmten Basen ausgegangen werden.

**Quality Phred Score** Für jede gemessene Base wurde der *Quality Phred Score* (Q) bestimmt (siehe Formel 3.1). Dieser ist definiert als der negative, zehnfache dekadische



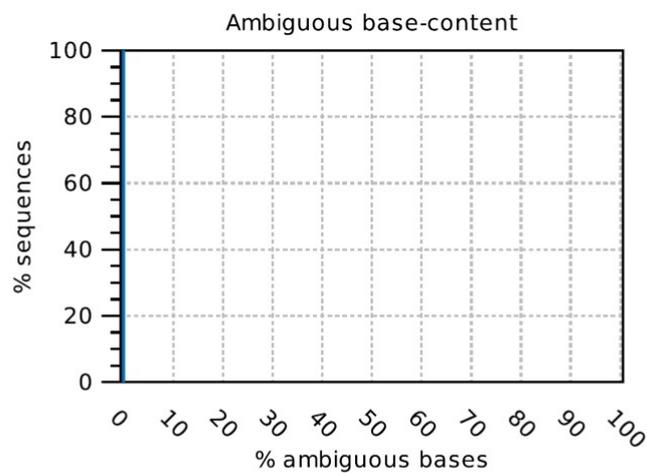
Combined coverage of G- and C-bases.

x: base position

y: number of G- and C-bases observed at current position normalized to the total number of bases observed at that position

#### Abbildung 3.4: GC-Anteil je Basenposition

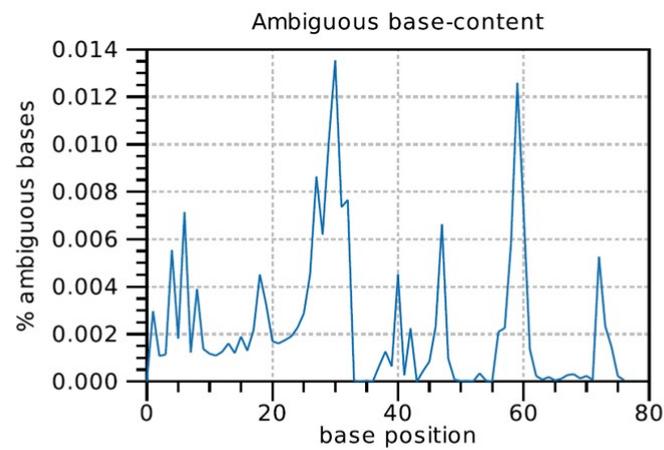
Dargestellt ist der prozentuale Anteil an gemessenen Guanin- und Cytosin-Basen an allen bestimmten Basen in Abhängigkeit von der Basenposition. Abbildung entnommen aus dem *Sequencing QC Report* von IMG Laboratory (Planegg).



Distribution of N-contents. The N-content of a sequence is calculated as the number of ambiguous bases compared to all bases.  
x: relative N-content of a sequence in percent  
y: number of sequences featuring particular N-percentages normalized to the total number of sequences

**Abbildung 3.5: Verteilung des Anteils uneindeutig bestimmter Basen**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Sequenzen in Abhängigkeit ihres Anteils an uneindeutig bestimmten Basen. Abbildung entnommen aus dem *Sequencing QC Report* von IMG Laboratory (Planegg).



Combined coverage of ambiguous bases.

x: base position

y: number of ambiguous bases observed at current position normalized to the total number of bases observed at that position

### Abbildung 3.6: Anteil uneindeutig bestimmter Basen je Basenposition

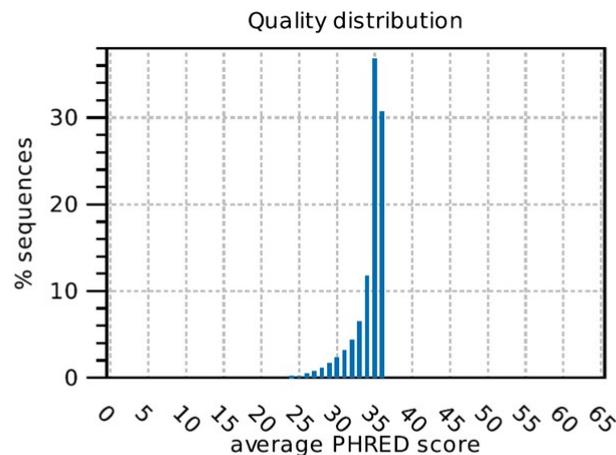
Dargestellt ist der prozentuale Anteil an uneindeutig bestimmten Basen an der Gesamtzahl bestimmter Basen in Abhängigkeit von ihrer Basenposition. Abbildung entnommen aus dem *Sequencing QC Report* von IMG Laboratory (Planegg).

Logarithmus der Wahrscheinlichkeit ( $P$ ), dass die betreffende Base falsch bestimmt wurde.

$$Q = -10 \log_{10} P \quad (3.1)$$

Bildet man den arithmetischen Mittelwert der Quality Phred Scores aller Basen einer Sequenz, erhält man den durchschnittlichen Phred Score dieser Sequenz. Die Verteilung dieses Werts ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Großteil der Sequenzen einen durchschnittlichen Phred Score von über 30 aufweisen. Insgesamt betrug der mittlere Phred Score ( $Q$ ) 34,35. Ein Phred Score von 30 entspricht einer Genauigkeit von 99,9 %.

In Abbildung 3.8 ist das 95 %-Konfidenzintervall des Phred Scores in Bezug auf die einzelnen Basenpositionen dargestellt. Der niedrigste Phred-Score für die fünfte Perzentile liegt bei ca. 14 und entspricht damit einer Genauigkeit von 96 %. Der höchste Wert der 95. Perzentile liegt bei ca. 36 und entspricht damit einer Genauigkeit von 99,97 %. Die Genauigkeiten sind also sowohl in Bezug auf die Sequenzen als auch auf die einzelnen Basenpositionen hoch. Somit kann von einer im Allgemeinen akkuraten Messung ausgegangen werden.



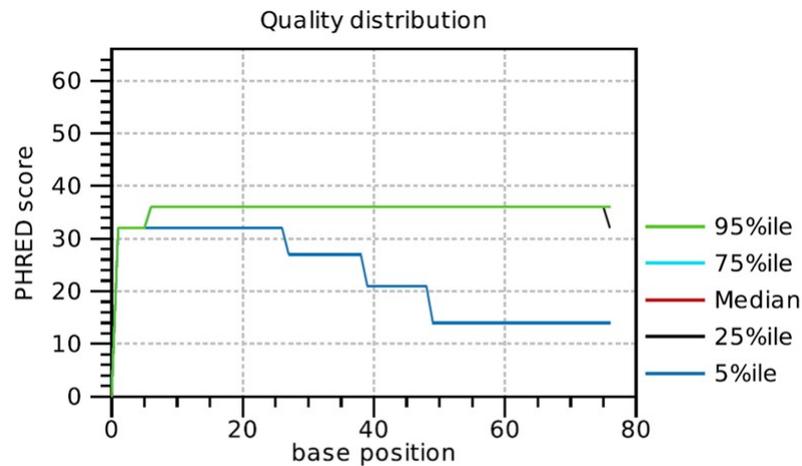
Distribution of average sequence quality scores. The quality of a sequence is calculated as the arithmetic mean of its base qualities.

x: PHRED-score

y: number of sequences observed at that qual. score normalized to the total number of sequences

**Abbildung 3.7: Häufigkeitsverteilung des durchschnittlichen Phred Scores**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Sequenzen in Abhängigkeit ihres durchschnittlichen Phred Scores. Abbildung entnommen aus dem *Sequencing QC Report* von IMG/M Laboratories (Planegg).



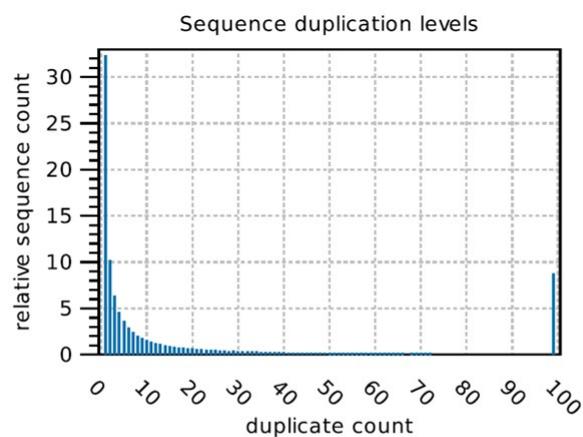
Base-quality distribution along the base positions.  
 x: base position  
 y: median & percentiles of quality scores observed at that base position

### Abbildung 3.8: 95%-Konfidenzintervall des Phred Scores pro Basenposition

Dargestellt ist das 95%-Konfidenzintervall des Phred Scores in Abhängigkeit von der jeweiligen Basenposition. Abbildung entnommen aus dem *Sequencing QC Report* von IMG/M Laboratories (Planegg).

**Überrepräsentierte Sequenzen** Die Zahl der mehrfach vorkommenden Sequenzen sollte möglichst gering sein, da ansonsten davon auszugehen ist, dass es durch einen systematischen Fehler während der PCR zu einer Anreicherung bestimmter Sequenzen gekommen ist. In Abbildung 3.9 kann man erkennen, dass bei der vorliegenden Untersuchung der Großteil der Sequenzen nur wenige Male mehrfach detektiert worden ist. Nur eine geringe Anzahl von Sequenzen wurde um die 100-mal detektiert, was zu keiner wesentlichen Verzerrung der Analyse führen sollte.

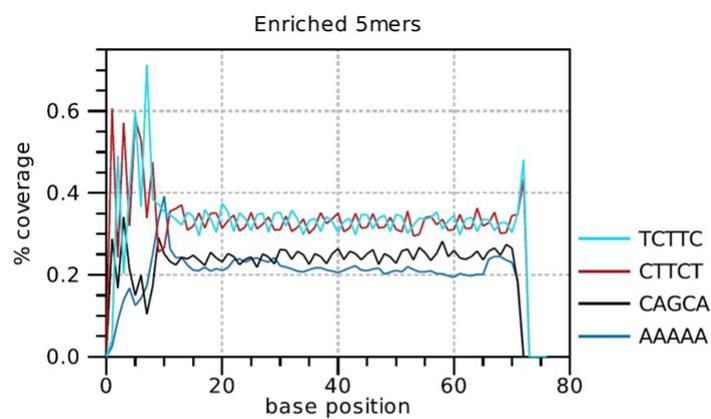
Eine weitere Kontrolle stellt die Untersuchung auf angereicherte Nukleotid-Pentamere dar. In Abbildung 3.10 sind die fünf am meisten überrepräsentierten Nukleotid-Pentamere in Abhängigkeit von ihrer Basenposition dargestellt. Wie man erkennen kann, nehmen diese Nukleotidabfolgen nicht einmal ein Prozent der jeweiligen Positionen ein, sodass von keiner bedenklichen Anreicherung von bestimmten Nukleotid-Pentameren ausgegangen werden muss.



Duplication level distribution. Duplication levels are simply the count of how often a particular sequence has been found.  
x: duplicate count  
y: number of sequences that have been found that many times normalized to the number of unique sequences

Abbildung 3.9: **Mehrfach vorkommende Sequenzen**

Dargestellt ist die relative Häufigkeit von mehrfach vorkommenden Sequenzen, normalisiert auf die Anzahl an einzigartigen Sequenzen, in Abhängigkeit von der Häufigkeit, wie oft eine Sequenz bestimmt worden ist. Abbildung entnommen aus dem *Sequencing QC Report* von IMG Laboratory (Planegg).



The five most-overrepresented 5mers. The over-representation of a 5mer is calculated as the ratio of the observed and expected 5mer frequency. The expected frequency is calculated as product of the empirical nucleotide probabilities that make up the 5mer. (5mers that contain ambiguous bases are ignored)

x: base position

y: number of times a 5mer has been observed normalized to all 5mers observed at that position

### Abbildung 3.10: Angereicherte Nukleotid-Pentamere

Dargestellt ist die relative Häufigkeit der fünf, statistisch gesehen, am meisten überrepräsentierten Nukleotid-Pentameren in Abhängigkeit von der jeweiligen Basenposition. Abbildung entnommen aus dem *Sequencing QC Report* von IMG Laboratory (Planegg).

### 3.2.2 Analyse der RNA-Sequenzierung

Als Referenzgenom diente das *mus musculus* Referenzgenom (GRCm38.p4) von NCBI. Ausgehend davon wurden die Expressionswerte bestimmt.

Um die Daten der RNA-Sequenzierung darauf zu untersuchen, ob eine grundsätzliche Korrelation unter den Versuchsbedingungen bestand, wurde eine Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis, PCA) durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden die einzelnen Proben als Datenpunkte in Abhängigkeit von zwei Hauptkomponenten auf einem Koordinatensystem aufgetragen, sodass Datenwolken entstehen. Proben, die denselben Bedingungen ausgesetzt waren, sollten näher beieinander liegen als Proben, die unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt waren, sofern diese Bedingungen die gemessene Größe verändern sollten. Zwar unterschieden sich die Proben der einzelnen Bedingungen untereinander, der größte Unterschied war aber zwischen den Probengruppen “basal” und “Glukose” auszumachen, wie man es bei einem Effekt der Glukosebehandlung auf die Genexpression erwarten würde. Es konnte also gezeigt werden, dass sich die Proben in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration, unter der sie inkubiert worden waren, unterschieden. Damit lässt sich für die RNA-Ebene ein grundsätzlicher Effekt der Glukose feststellen.

Von den 45.765 untersuchten Genen und Genloci waren unter der Berücksichtigung einer Veränderung mindestens um den Faktor 2 und eines Signifikanzniveaus von  $\leq 0,05$  641 Gene hoch- und 766 Gene herunterreguliert. Wurde nur eine Veränderung um mindestens den Faktor 3 bei gleichem Signifikanzniveau berücksichtigt, waren 285 Gene hoch- und 312 Gene herunterreguliert (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Anzahl der in der RNA-Sequenzierung unterschiedlich exprimierten Gene unter Anwendung eines Signifikanzniveaus  $\leq 0,05$  unter Berücksichtigung einer Veränderung mindestens um den Faktor 2 und mindestens um den Faktor 3.

Faktor	hoch	runter
$\geq 2$	641	766
$\geq 3$	285	312

Einen Überblick über die durch Glukose differenziert exprimierten Gene gibt der *Volcano Plot* in Abbildung 3.11. Der *Volcano Plot* stellt die statistische Signifikanz in Form der p-Werte ins Verhältnis zum Effekt von Glukose auf die Veränderung der Genexpression, repräsentiert durch den *fold change*. Gene mit niedrigen p-Werten finden sich in der Graphik weiter oben, Gene mit größerem absolutem *fold change* weiter rechts bzw. links.

Die Daten der RNA-Sequenzierung wurden außerdem einer Analyse der Signal- und Biosynthesewege unterzogen. Hier konnte festgestellt werden, dass durch die Behandlung verschiedenste Signal- und Biosynthesewege in ihrer Aktivität beeinflusst wurden. Von den untersuchten Signal- und Biosynthesewegen zeigte sich die Cholesterin-Biosynthese (Abbildung 3.12) am stärksten beeinflusst. Die Betrachtung der einzelnen Enzyme der Cholesterin-Biosynthese ergab, dass die meisten von Ihnen unter der hohen Glukosekonzentration in ihrer Expression auf RNA-Ebene verstärkt waren.

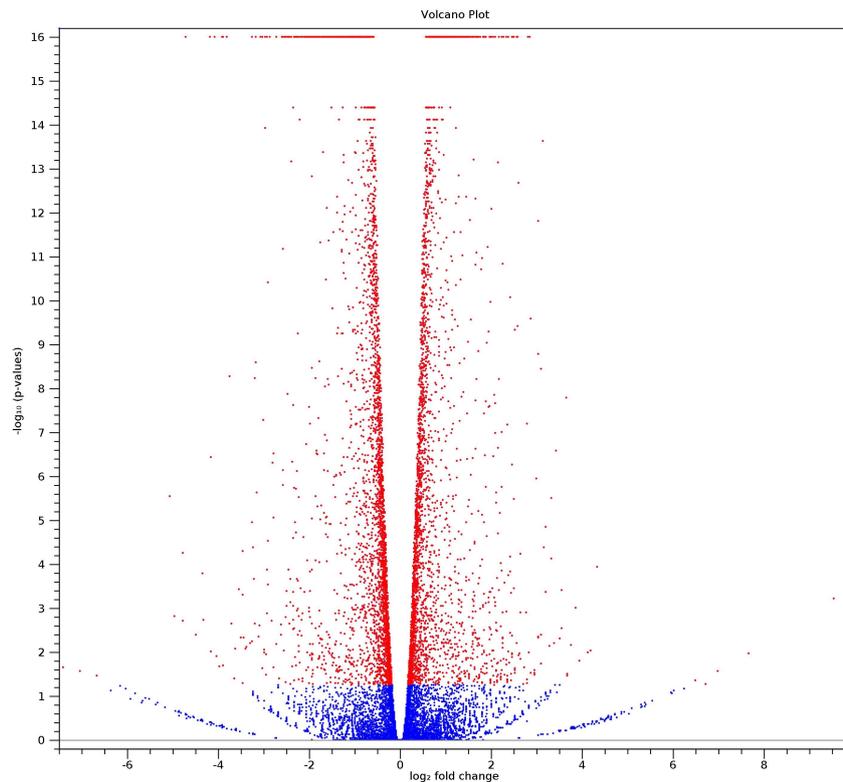


Abbildung 3.11: **Volcano Plot RNA-Sequenzierung**

Darstellung der durch Glukose differenziert exprimierten Gene als sogenannter *Volcano Plot*. Angabe der p-Werte als negativ-dekadischer Logarithmus in Abhängigkeit vom Expressionsverhalten des jeweiligen Gens, abgebildet als binärer Logarithmus des *fold change*. Je kleiner der p-Wert, desto weiter oben auf der Ordinate und je größer eine Induktion bzw. Repression eines Gens durch Glukose, desto weiter rechts bzw. links auf der Abszisse befindet sich der Datenpunkt. *False discovery rate* korrigierte p-Werte  $< 0,05$  in Rot. Abbildung entnommen aus dem Bericht von IMG Laboratory (Planegg).

Die Signal- und Biosyntheseweg-Analyse der Cholesterin-Biosynthese ergab fünf Gene, die wichtige Enzyme dieses Prozesses kodieren und stark durch Glukose beeinflusst wurden: *Dhcr7* (7-Dehydrocholesterol-Reduktase), *Acat2* (Acetyl-CoA-Acetyltransferase 2), *Mvk* (Mevalonatkinase), *Hsd17b7* (Hydroxysteroid-17- $\beta$ -Dehydrogenase 7 = 3-Ketosteroidreduktase), *Hmgcs1* (zytosolische Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Synthase). Die basalen RPKM-Werte lagen zwischen 6 und 51 und zeigten damit eine deutliche Expression. Die RPKM-Werte unter der Glukose-Bedingung lagen zwischen 24 und 200. Bei jedem der fünf Gene war eine deutliche Steigerung der Expression durch Glukose zu verzeichnen, die je nach Gen zwischen ungefähr drei und annähernd fünf lag.

Verschiedenste weitere Pathways waren in ihrer Expression signifikant verändert. Insbesondere der Ungefalteten Protein Antwort (Abbildung 3.13), der Mevalonatweg und die Phospholipasen.

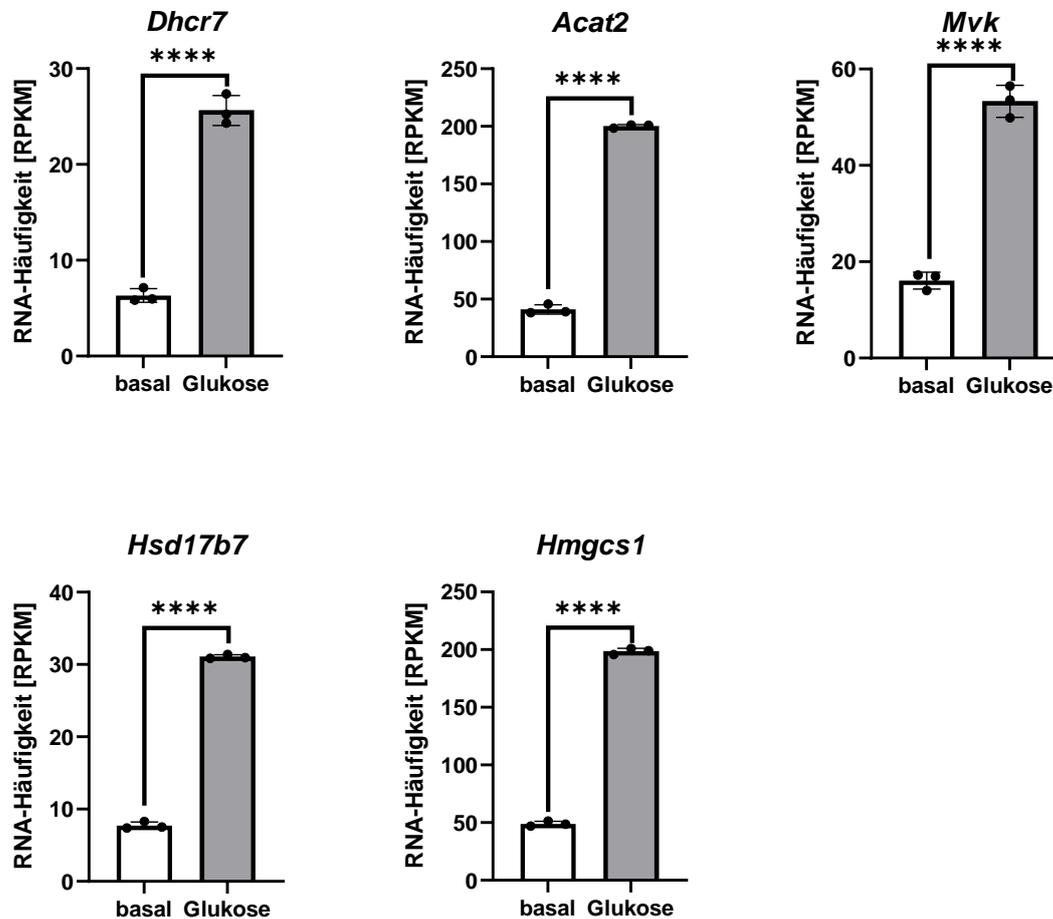


Abbildung 3.12: Cholesterin-Biosyntheseweg

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Dargestellt sind die im Rahmen der RNA-Sequenzierung aus drei unabhängigen Experimenten gewonnenen RPKM-Werte der Enzyme der Cholesterin-Biosynthese, die sich in der Analyse der Signal- und Biosynthesewege als durch Glukose beeinflusst gezeigt hatten. Darstellung in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration (basal = 0 mM Glukose, Glukose = 2,5 mM Glukose). Die p-Werte wurden mit Hilfe der *False Discovery Rate* Methode korrigiert. *Dhcr7* = 7-Dehydrocholesterol-Reduktase ( $p < 0,0001$ ), *Acat2* = Acetyl-CoA-Acetyltransferase 2 ( $p < 0,0001$ ), *Mvk* = Mevalonatkinase ( $p < 0,0001$ ), *Hsd17b7* = Hydroxysteroid-17- $\beta$ -Dehydrogenase 7 = 3-Ketosteroidreduktase ( $p < 0,0001$ ), *Hmgcs1* = zytosolische Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Synthase ( $p < 0,0001$ ).

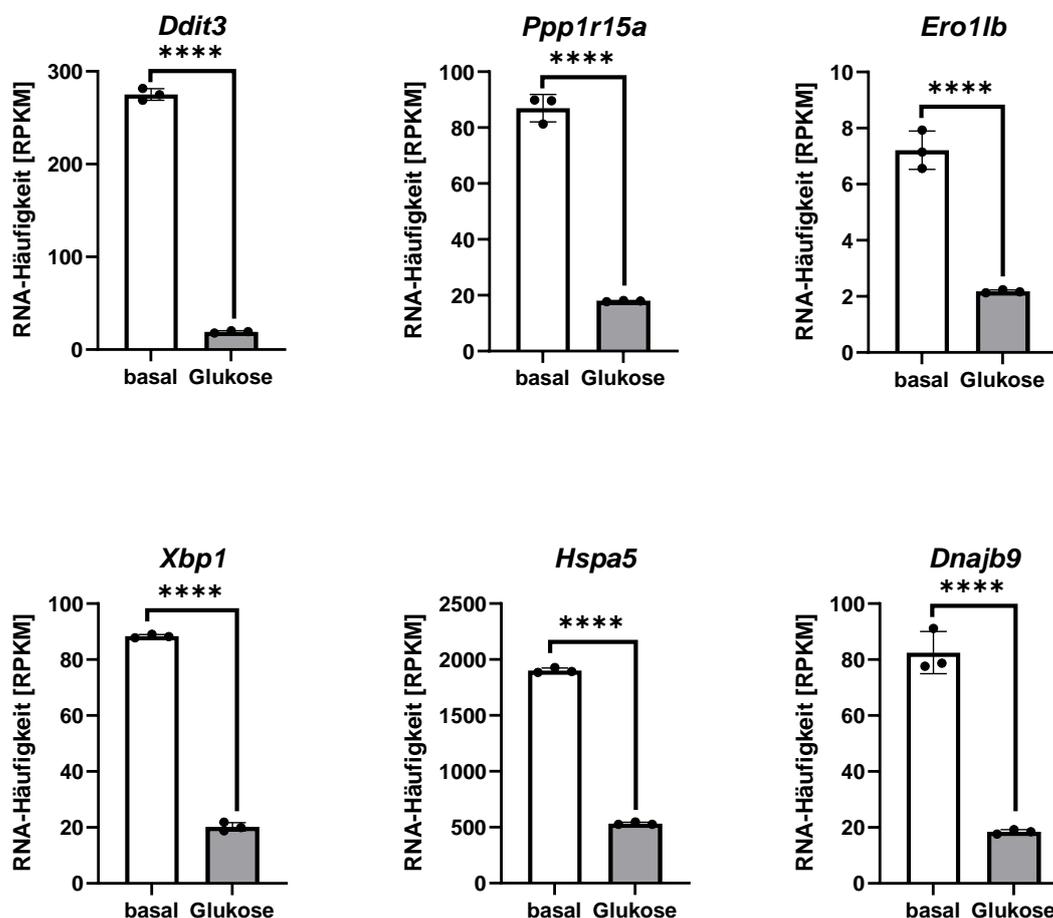


Abbildung 3.13: **Ungefaltete Protein-Antwort**

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Dargestellt sind die im Rahmen der RNA-Sequenzierung aus drei unabhängigen Experimenten gewonnenen RPKM-Werte der Gene der ungefalteten Protein-Antwort (Unfolded Protein Response), die sich in der Analyse der Signal- und Biosynthesewege als besonders durch Glukose beeinflusst gezeigt hatten. Darstellung in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration (basal = 0 mM Glukose, Glukose = 2,5 mM Glukose). Die p-Werte wurden mit Hilfe der *false discovery rate* Methode korrigiert. *Ddit3* = DNA damage-inducible transcript 3 ( $p < 0,0001$ ), *Ppp1r15a* = Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A ( $p < 0,0001$ ), *Ero1lb* = endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 like protein  $\beta$  ( $p < 0,0001$ ), *Xbp1* = X-box binding protein 1 ( $p < 0,0001$ ), *Hspa5* = heat shock protein family A (Hsp70) member 5 ( $p < 0,0001$ ), *Dnajb9* = DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B9 ( $p < 0,0001$ ).

Die Untersuchung der ungefalteten Protein Antwort ergab sechs Gene, die in ihrer Expression stark durch Glukose beeinflusst wurden: *Ddit3* (DNA damage-inducible transcript 3), *Ppp1r15a* (Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A), *Ero1b* (Endoplasmic reticulum oxidoreductase 1 like protein  $\beta$ ), *Xbp1* (X-box binding protein 1), *Hspa5* (heat shock protein family A (Hsp70) member 5), *Dnajb9* (DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B9). Alle sechs Gene waren unter basalen Bedingungen deutlich stärker exprimiert als unter Glukose. Glukose führte also zu einer Verringerung der Expression dieses Signalwegs. Die basalen RPKM-Werte lagen zwischen 6 und fast 2000. Unter Glukose waren dagegen RPKM-Werte zwischen 2 und 550 festzustellen. Es kam damit zu 3- bis 14-fachen Verringerungen der Expression innerhalb dieser Gruppe.

Die unter dem Mevalonatweg zusammengefassten Gene, die sich durch die Glukosebehandlung wesentlich beeinflusst gezeigt hatten, waren drei, die auch im Rahmen des Cholesterin-Biosyntheseweges identifiziert worden waren: *Acat2*, *Mvk* und *Hmgcs1*.

Unter die Phospholipasen (Abbildung 3.14) fielen fünf weitere durch Glukose wesentlich in ihrer Expression beeinflusste Gene: *Hmox1* (Hämoxigenase 1), *Lcat* (Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase), *Pla2g4c* (Phospholipase A2 Gruppe IVC = cytosolische Phospholipase A2  $\gamma$ ), *Pnpla3* (patatin like phospholipase domain containing 3), *Lipg* (Lipase G, endothelialer Typ). Das Expressionsverhalten der Gene dieser Gruppe war sowohl quantitativ als auch qualitativ inhomogen. Während *Hmox1* mit einem mittleren basalen Wert von um die 320 sehr stark exprimiert war, befanden sich die basalen RPKM-Werte der anderen Gene deutlich unter 1 und konnten damit als unter basalen Bedingungen effektiv nicht exprimiert angesehen werden. Unter Glukose wiederum kam es bei *Hmox1* zu einer deutlichen Verringerung der Expression auf unter 100 RPKM, während die anderen Gene stark induziert wurden, wobei *Lcat* und *Lipg* sogar RPKM-Werte über 1 aufwiesen und damit nun als exprimiert angesehen werden konnten.

Außerdem wurden verschiedene Gengruppen betrachtet, die in Bezug auf Glukosestoffwechsel, Signaltransduktion und Zellstoffwechsel von Bedeutung sind. Die Auswahl erfolgte nach der bekannten Bedeutung der jeweiligen Gruppen. Einige dieser Gruppen waren weitgehend homogen hoch- oder herunterreguliert, andere Gengruppen wiederum reagierten heterogen in ihrem Expressionsverhalten auf die applizierten Glukosekonzentrationen.

### 3.3 RT-qPCR: Validierung der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung

Die anhand der RNA-Sequenzierung ausgewählten Gengruppen wurden sodann in einem weiteren Schritt mit Hilfe von RT-qPCR-Analysen neu gewonnener Proben genauer untersucht und damit auch das in der RNA-Sequenzierung gezeigte Expressionsverhalten auf seine Reproduzierbarkeit hin überprüft. Es wurden RNA-Proben aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten gewonnen, mit deren Hilfe cDNA hergestellt wurde. Das relative Expressionsverhalten von 110 Genen und 2 Referenzgenen wurde sodann mit Hilfe des qPCR-Verfahrens in allen drei Probengruppen untersucht. Hierzu wurden über

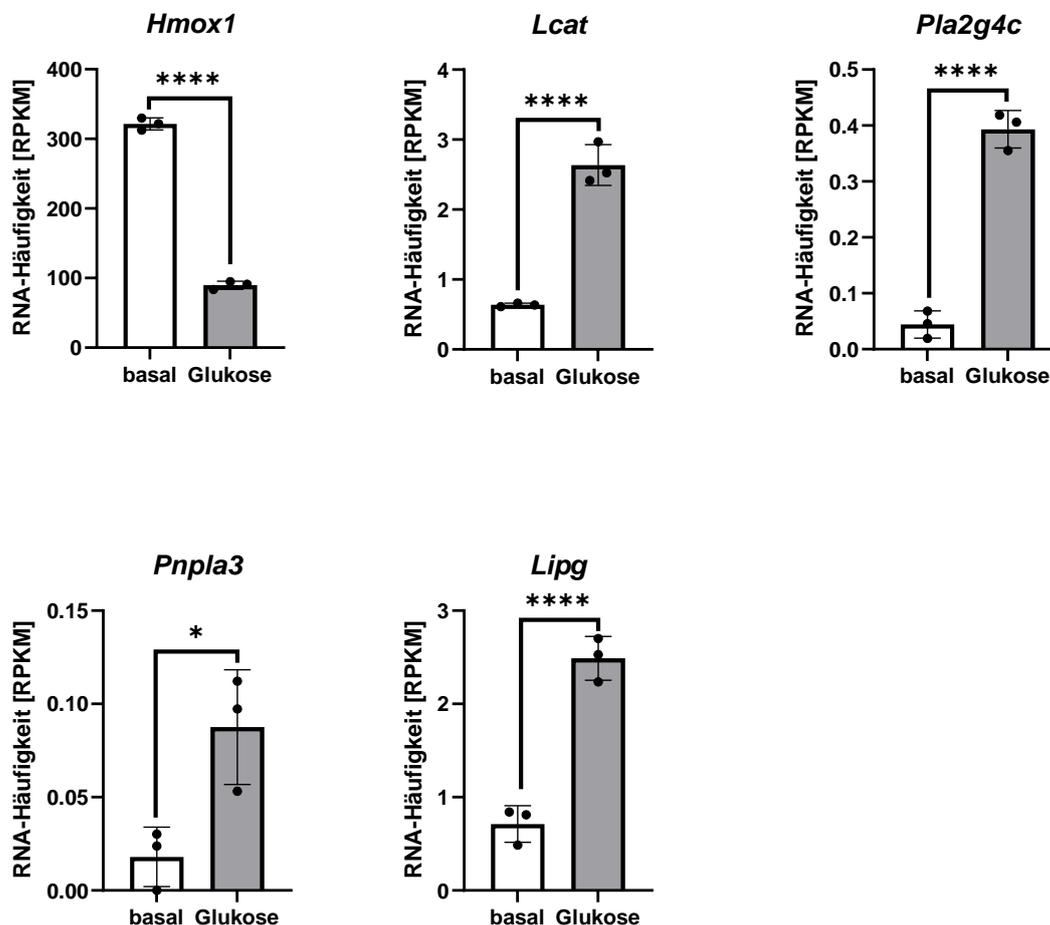


Abbildung 3.14: **Phospholipasen**

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Dargestellt sind die im Rahmen der RNA-Sequenzierung aus drei unabhängigen Experimenten gewonnenen RPKM-Werte der Gene der Phospholipasen, die sich in der Analyse der Signal- und Biosynthesewege als besonders durch Glukose beeinflusst gezeigt hatten. Darstellung in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration (basal = 0 mM Glukose, Glukose = 2,5 mM Glukose). Die p-Werte wurden mit Hilfe der *false discovery rate* Methode korrigiert. *Hmox1* = Hämoxygenase 1 ( $p < 0,0001$ ), *Lcat* = Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase ( $p < 0,0001$ ), *Pla2g4c* = Phospholipase A2 Gruppe IVC = cytosolische Phospholipase A2  $\gamma$  ( $p < 0,0001$ ), *Pnpla3* = patatin like phospholipase domain containing 3 ( $p = 0,0438$ ), *Lipg* = Lipase G, endothelialer Typ ( $p < 0,0001$ ).

27 96-Well-Platten (also knapp 2.600 Mirko-Wells) pipettiert.

### 3.3.1 Normierung, Referenz- und Haushaltsgene

Zur Normierung von qPCR-Daten ist es notwendig, Gene zu identifizieren, die sowohl theoretisch als auch empirisch nicht durch die untersuchte Behandlung in ihrer Expression verändert werden (sollten). Auf deren Expressionsverhalten wird dann das Expressionsverhalten der übrigen Gene normiert. Dies dient zudem dem Ausgleich von Verfahrensfehlern und Ungenauigkeiten in der Probengröße, die bei derart kleinen Volumina und störungsanfälligen Verfahren zwangsläufig auftreten. Diese Gene bezeichnet man deshalb als Referenzgene, gemeinhin auch "Haushaltsgene" genannt, da diese Proteine konstitutiv vorliegen und in ihrer Menge nicht dynamisch reguliert werden. Um derartige Gene zu identifizieren, die durch die angewandte Glukosebehandlung in ihrer Expression nicht beeinflusst werden, wurden geläufige Referenzgene in der RNA-Sequenzierung auf ihre Beeinflussbarkeit durch Glukose hin untersucht. Von den als Referenzgenen etablierten Genen wurden vier ausgewählt, die sich durch die Glukosebehandlung nicht beeinflusst zeigten. Diese waren: *Tbp*, *Sdha*, *Actb*, *Gapdh*. Zunächst wurden diese Gene darauf untersucht, ob sie auch im Rahmen der qPCR-Analysen eine unveränderte Expression bei Veränderung der Glukosekonzentration des Mediums zeigen würden (Abbildung 3.15). *Actb* und *Gapdh* zeigten sowohl in der RNA-Sequenzierung als auch in den RT-qPCR-Analysen eine erhöhte Expression unter erhöhten Glukosekonzentrationen. Außerdem wurde der Zusammenhang zwischen cDNA-Verdünnung und  $C_q$ -Wert auf seine Linearität hin überprüft. Ein linearer Zusammenhang zwischen Verdünnung und  $C_q$ -Wert ist ein Qualitätsmerkmal. Diese Linearität sollte eine gleichförmige Steigung unabhängig von den Versuchsbedingungen besitzen. Da die gesamte statistische Analyse der RT-qPCR-Daten von den Referenzgenen abhängt, war die Qualität und Reproduzierbarkeit der zur Normierung heranzuziehenden Gene von besonderer Wichtigkeit. Bis auf *Gapdh* zeigten alle vier Gene einen linearen Kurvenverlauf, der unter den angewendeten Glukosekonzentrationen annähernd parallel verlief. Bei *Gapdh* dagegen änderte sich unter Hochglukose der lineare Zusammenhang in seiner Steigung. Aufgrund dieser Beobachtung wurden *Tbp* und *Sdha* als die von den Vieren am besten geeigneten Gene zur Normierung der qPCR-Daten identifiziert und dienten im Folgenden als Referenzgene. *Tbp* und *Sdha* zeigten zudem eine unterschiedliche Expression im Vergleich zueinander. Dies wurde als hilfreich angesehen, da so je ein Referenzgen eine höher und eine niedriger exprimierte Gengruppe repräsentierte. Sollten die Versuchsbedingungen Gene in Abhängigkeit von ihrem Expressionsniveau unter Kontrollbedingungen unterschiedlich in ihrer Transkription beeinflussen, ließ sich dies durch verschieden stark exprimierte Referenzgene leichter identifizieren.

### 3.3.2 Allgemeiner Überblick

Zur Durchführung der RT-qPCR wurden die ausgewählten Gene in Gruppen eingeteilt, die gemeinsam untersucht wurden. Aufgrund des Pipettierschemas hatten pro 96-Well-Platte maximal 14 Zielgene und 2 Referenzgene Platz. Welche Gene gemeinsam auf einer

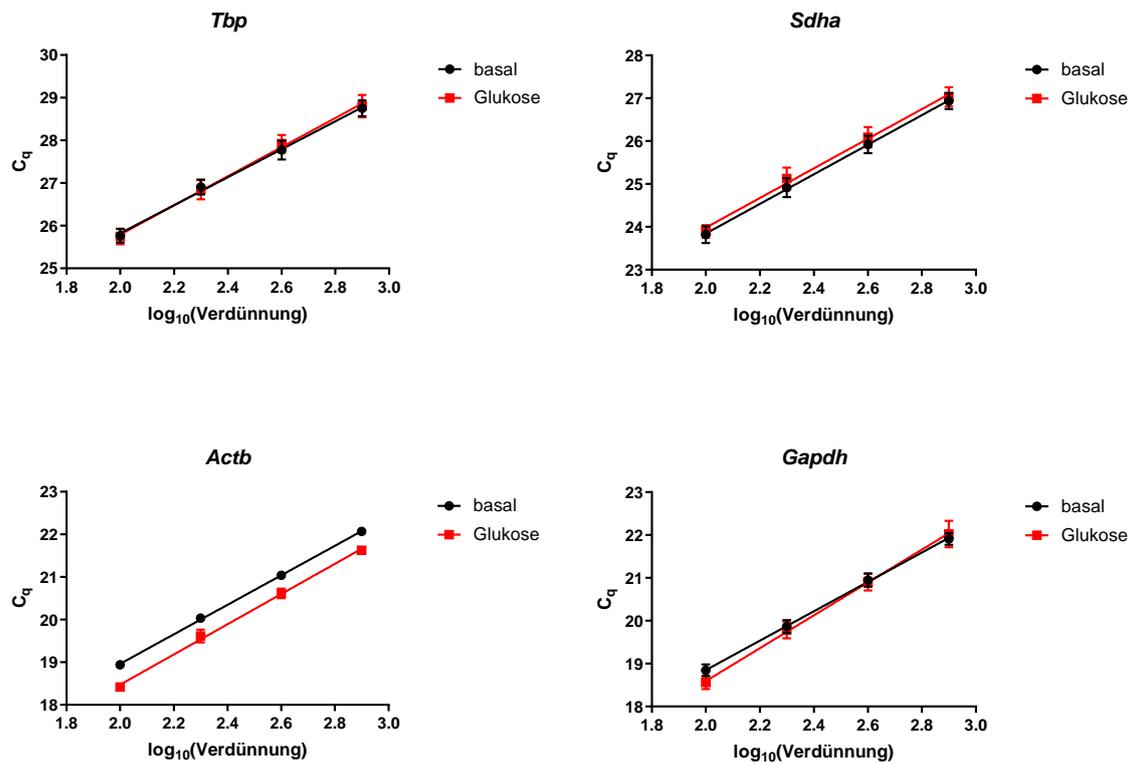


Abbildung 3.15: Einfluss der cDNA-Verdünnung der Referenzgene auf den RNA-Nachweis

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Dargestellt sind die im Rahmen der RT-qPCR aus drei unabhängigen Experimenten gewonnenen Werte des *Cycle of quantification* ( $C_q$ ) der Referenzgene *Tbp*, *Sdha*, *Actb* und *Gapdh* in Abhängigkeit von der logarithmisch aufgetragenen Verdünnung der cDNA (100-, 200-, 400- und 800-fach) und der Behandlung durch Glukose (schwarz: basal, 0 mM Glukose; rot: Glukose, 2,5 mM Glukose).

Well-Platte untersucht wurden, wurde anhand der Funktion und Größe der Gengruppe entschieden. Das Ergebnis dieser Einteilung waren acht Gruppen von Zielgenen. Durch den Vergleich mit den Ergebnissen der RNA-Sequenzierung ließen sich die Zielgene in zwei Teile unterteilen: Im einen Teil ließ sich die Tendenz der RNA-Sequenzierung (Induktion, Repression oder Gleichheit der Expression durch Glukose) in der qPCR reproduzieren. Im anderen Teil dagegen ließ sich die Tendenz der RNA-Sequenzierung nicht reproduzieren. Im Allgemeinen waren die Effekte der Glukose in der RNA-Sequenzierung zumeist stärker als in der RT-qPCR.

Die im Folgenden angegebenen Werte sind zur besseren Lesbarkeit gerundet, wobei die RPKM-Werte auf eine Nachkommastelle und die Prozent-Werte auf ganze Zahlen gerundet wurden. Die relative Expression, die im Folgenden in Prozent angegeben wird, wurde jedoch aus den nicht gerundeten Ausgangswerten berechnet und erst anschließend gerundet. Daraus erklären sich mögliche Abweichungen zwischen den angegebenen relativen Expressionswerten und den relativen Expressionen auf Basis der gerundeten RPKM-Werte.

### 3.3.3 Insulin- und IGF-Signalweg

**Übersicht** In dieser Gruppe wurden drei Rezeptoren, nämlich der Insulinrezeptor (*Insr*)<sup>4</sup>, der *Insulin Like Growth Factor 1 Rezeptor* (*Igf1r*)<sup>5</sup> und der *Insulin Like Growth Factor 2 Rezeptor* (*Igf2r*)<sup>6</sup>, sowie deren zwei Vermittlerproteine das Insulinrezeptorsubstrat 1 und 2 (*Irs1*<sup>7</sup> und *Irs2*<sup>8</sup>) zusammengefasst, um den Einfluss von Glukose auf den Insulin-Signalweg näher zu untersuchen (Abbildung 3.16). Die Insulinrezeptorsubstrate verbinden die Rezeptoren für Insulin und Insulin Like Growth Factor 1 mit den nachfolgenden Signalkaskaden. Hier sind im Wesentlichen der Proteinkinase B- (oder AKT-)Signalweg und der RAS-RAF-ERK-Signalweg zu nennen (Le *et al.*, 2023).

***Insr*** Beim Insulinrezeptor handelt es sich um eine heterotetramere Rezeptortyrosinkinase, die nach Bindung von Insulin eine Autophosphorylierung durchführt, was dann zur Bindung der Insulinrezeptorsubstrate führt (Lee & Pilch, 1994). Der Insulinrezeptor hatte in der RNA-Sequenzierung eine Reduktion von seiner Expression von 4,2 RPKM auf 3,7 RPKM gezeigt. Diese Reduktion um 13,3 % ließ sich in der RT-qPCR jedoch nicht bestätigen. Hier zeigte sich der Insulinrezeptor durch Glukose nicht beeinflusst.

***Igf1r*** Der *Igf1r*, der in seinen nachgeschalteten Signalwegen im Wesentlichen dem *Insr* gleicht, war in der RNA-Sequenzierung durch Glukose von 5,5 RPKM auf 7,2 RPKM um 31 % induziert worden. Dies ließ sich auf fast annähernd gleich hohem Niveau auch in der RT-qPCR-Analyse reproduzieren, wo sich bei Normierung auf *Tbp* eine Induktion um 21 % und auf *Sdha* um 28 % ergab.

<sup>4</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16337> aufgerufen am 08.03.2022.

<sup>5</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16001> aufgerufen am 08.03.2022.

<sup>6</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16004> aufgerufen am 08.03.2022.

<sup>7</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16367> aufgerufen am 08.03.2022.

<sup>8</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/384783> aufgerufen am 08.03.2022.

**Igf2r** Dem IGF2R wird im Gegensatz zum INSR und dem IGF1R die Rolle eines “aufräumenden” Rezeptors zugesprochen, der, indem er IGF2 bindet und dem lysosomalen Abbau zuführt, dessen Wirkung auf den IGF1R begrenzt (Tian *et al.* , 2014). Der *Igf2r* war in der RNA-Sequenzierung mit 30 RPKM unter basalen Bedingungen relativ stark exprimiert und wurde durch Glukose um 45 % auf 18,1 RPKM in seiner Expression reduziert. Dieser Effekt ließ sich in der RT-qPCR allerdings nicht reproduzieren. Stattdessen zeigte der *Igf2r* hier keinerlei signifikante Veränderung in seiner Expression durch die Versuchsbedingungen.

**Irs** Von den insgesamt 6 Isoformen des Insulinrezeptorsubstrats wurden die beiden wichtigsten *Irs1* und *Irs2* untersucht. Das *Irs1* zeigte eine deutliche Induktion durch Glukose in der RNA-Sequenzierung von 1,5 RPKM auf 3,7 RPKM, also eine Steigerung um fast das 2,5-fache. In der RT-qPCR ließ sich die Tendenz der Induktion reproduzieren, allerdings nicht in dieser Höhe. Es zeigte sich hier nur eine Induktion von annähernd 50 %. Das *Irs2* zeigte sich bei einem RPKM-Wert von etwas über 8 in der RNA-Sequenzierung nicht durch Glukose signifikant beeinflusst. Dies ließ sich auch in der RT-qPCR reproduzieren.

### 3.3.4 Insulin-induziertes Gen 1 und 2 (INSIG1/2)

**Insig1** Das *Insulin induced gene 1* (INSIG1)<sup>9</sup> ist Teil des SREBP-SCAP-INSIG-Komplexes des endoplasmatischen Retikulums. Bei hohen Cholesterin-Konzentrationen hält INSIG1 den Transkriptionsfaktor SREBP in der Membran des endoplasmatischen Retikulums zurück, sodass dieser die Transkription des LDL-Rezeptors nicht fördern kann (Gong *et al.* , 2006). Außerdem bindet INSIG1 bei hohen Cholesterinkonzentrationen das Schlüsselenzym der Cholesterin-Biosynthese, die HMG-CoA-Reduktase, und bewirkt so deren Ubiquitinylierung und Abbau (Lee *et al.* , 2006). *Insig1* hatte in der RNA-Sequenzierung eine starke Induktion um 118 % von 69,2 RPKM auf 150,9 RPKM gezeigt. Diese Tendenz ließ sich auch in der RT-qPCR-Analyse nachweisen, wenn auch nicht in einer ebenso großen Stärke, sondern mit 34 % unter Normierung auf *Tbp* und 43 % unter Normierung auf *Sdha* deutlich schwächer (Abbildung 3.17).

**Insig2** Das *Insulin induced gene 2* (*Insig2*, Funktion: Oxysterol-Bindung, Beteiligung u.a. an der Cholesterin-Biosynthese, der Morphogenese des Ohres und der negativen Regulation der Fett-Biosynthese, Teil des SREBP-SCAP-Insig-Komplexes)<sup>10</sup> zeigte sich wie in der RNA-Sequenzierung, wo es eine Expression um die 11 RPKM aufwies, auch in der RT-qPCR nicht durch die Versuchsbedingungen beeinflusst (*Tbp*: 3 %; *Sdha*: 8 %).

<sup>9</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/231070> aufgerufen am 08.03.2022.

<sup>10</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/72999> aufgerufen am 08.03.2022.

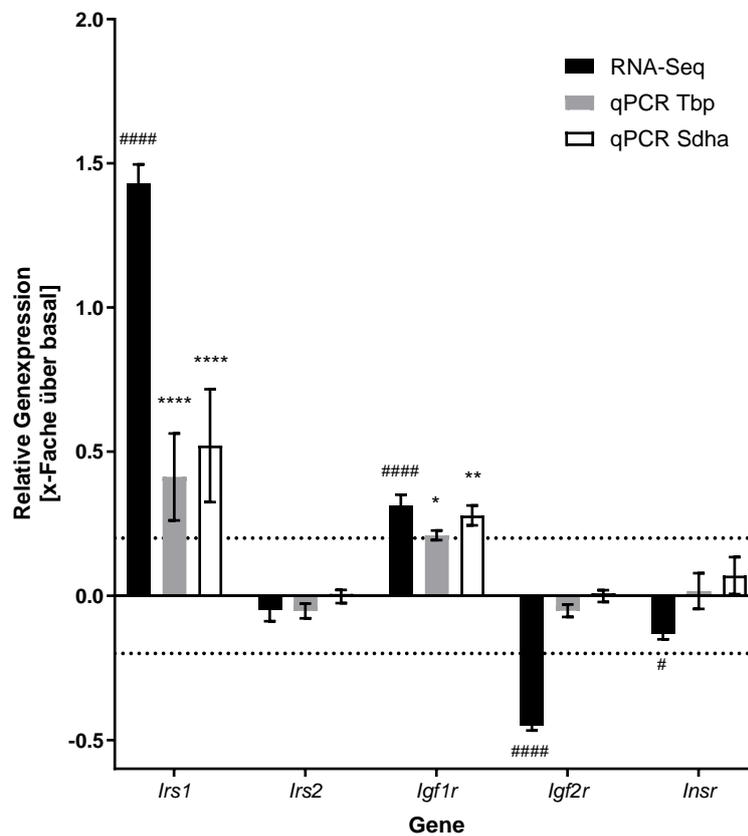


Abbildung 3.16: **Insulin- und IGF-Signalweg**

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Darstellung der relativen Expression der Insulinrezeptorsubstrate 1 und 2 (*Irs1* und *Irs2*) sowie des Insulinrezeptors (*Insr*) und der Insulin Like Growth Factor 1 und 2 Rezeptoren (*Igf1r* und *Igf2r*). In Schwarz die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Signifikante Unterschiede sind mit # markiert. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit Hilfe des Wald-Tests, False-Discovery-Rate korrigiert nach Benjamini und Hochberg,  $n = 3$ . In Grau die Ergebnisse der RT-qPCR normiert auf das Referenzgen *Tbp* und in Weiß auf das Referenzgen *Sdha*. Signifikante Unterschiede gemäß two-way ANOVA sind mit \* markiert,  $n = 3$ .

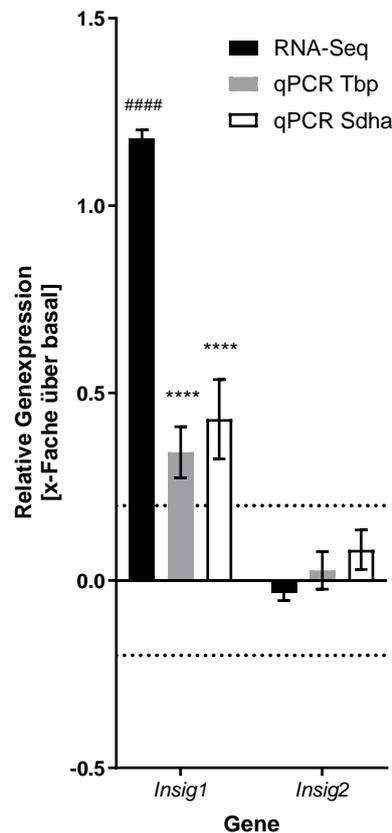


Abbildung 3.17: **Insulin-induzierte Gene 1 und 2**

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Darstellung der relativen Expression von *Insig1* und *Insig2*. In Schwarz die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Signifikante Unterschiede sind mit # markiert. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit Hilfe des Wald-Tests, False-Discovery-Rate korrigiert nach Benjamini und Hochberg,  $n = 3$ . In Grau die Ergebnisse der RT-qPCR normiert auf das Referenzgen *Tbp* und in Weiß auf das Referenzgen *Sdha*. Signifikante Unterschiede gemäß two-way ANOVA sind mit \* markiert,  $n = 3$ .

### 3.3.5 RAS-GTPasen

**Übersicht** Wie bereits oben besprochen, ist einer der durch die IRS vermittelten Signalwege der RAS-RAF-ERK-Signalweg. Dieser Signalweg spielt nicht nur in der Signaltransduktion von Insulin und IGF eine wichtige Rolle, sondern seine Vertreter sind auch als wichtige Onkogene bei verschiedensten Krebsarten bekannt (Samatar & Poulikakos, 2014). In der nun folgenden Gruppe wurde der Einfluss der Glukose auf die Genexpression ausgewählter Vertreter der RAS-Proteinfamilie (*Hras*, *Kras*, *Nras*, *Rras*) untersucht (Abbildung 3.18). Die RAS-Proteine sind GTPasen, welche GTP zu GDP hydrolysieren. Nach erfolgter Hydrolyse wird das GDP mit Hilfe sogenannter Guaninnukleotid Austauschfaktoren (Englisch: Guanosine triphosphate Exchange Factor, GEF) durch GTP ersetzt. Die ebenfalls in dieser Gruppe untersuchten Gene *Sos1* und *Sos2* stellen ebensolche GEFs dar und verbinden über GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) die IRS mit der RAS-RAF-ERK-Singalkaskade. Die Hydrolyse selbst wird zusätzlich durch sogenannte GTPase aktivierende Proteine (GAP) erleichtert (Olson & Marais, 2000). Um den Kreis zu schließen wurde noch ein Vertreter dieser GTPase aktivierenden Proteine, das *RAS P21 Protein Activator 1* (*Rasa1*) ebenfalls in dieser Gruppe untersucht.

**Hras** Das *Harvey rat sarcoma virus oncogene* (*Hras*)<sup>11</sup> hatte in der RNA-Sequenzierung unter Glukose eine Induktion von 34 % von 17,2 RPKM auf 23,2 RPKM gezeigt. Eine Induktion konnte auch in der RT-qPCR in abgeschwächter Form nachgewiesen werden. Unter Normierung auf *Tbp* betrug diese 15 % und unter Normierung auf *Sdha* 22 %, wobei der Effekt nur bei Normierung auf das Referenzgen *Sdha* signifikant war.

**Kras** In der RNA-Sequenzierung hatte das *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (*Kras*)<sup>12</sup> unter Glukose eine Reduktion seiner Expression um 17 % von 29,6 RPKM auf 24,5 RPKM erfahren. In der RT-qPCR dagegen war das Gen durch die Glukose in seiner Expression nicht signifikant beeinflusst worden.

**Nras** Die vom *Neuroblastoma ras oncogene* (*Nras*)<sup>13</sup> gezeigte leichte Induktion in der RNA-Sequenzierung um 17 % von 30,1 RPKM auf 35,2 RPKM ließ sich in stärkerem Maße auch in der RT-qPCR-Analyse beobachten, und zwar um 25 % unter Normierung auf *Tbp* und 32 % unter Normierung auf *Sdha*. Allerdings war die Messung mit einem relativ großen Fehlerbereich behaftet.

**Rras** Das *Related RAS viral (r-ras) oncogene* (*Rras*)<sup>14</sup> hatte in der RNA-Sequenzierung eine leichte Veränderung der Genexpression unter Glukose um 14 % von 27,1 RPKM auf 30,7 RPKM gezeigt. Dies ließ sich auch in seiner Tendenz in der RT-qPCR zeigen. So

<sup>11</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/15461> aufgerufen am 08.03.2022.

<sup>12</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/15461> aufgerufen am 08.03.2022.

<sup>13</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/18176> aufgerufen am 08.03.2022.

<sup>14</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20130> aufgerufen am 08.03.2022.

ergab die Normierung auf *Tbp* eine Induktion um 11 % und auf *Sdha* um 16 %. Diese Beobachtungen waren jedoch sowohl in der RNA-Sequenzierung, als auch in der RT-qPCR nicht signifikant, sodass von keinem relevanten Einfluss der Glukose auf die Expression von *Rras* gesprochen werden kann.

**Sos** Die beiden Guaninnukleotid-Austauschfaktoren SOS1 (*SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1*)<sup>15</sup> und SOS2 (*SOS Ras/Rho guanine nucleotide exchange factor 2*)<sup>16</sup> hatten in der RNA-Sequenzierung noch gegensätzliche Reaktionen ihrer RNA-Expression unter Glukose gezeigt. So war *Sos1* durch Glukose um 19 % von 7,2 RPKM auf 8,6 RPKM in seiner Expression gesteigert worden, wohingegen *Sos2* eine Reduktion seiner Expression unter Glukose um 16 % von 6,3 RPKM auf 5,4 RPKM zeigte. Beide Gene zeigten sich in der RT-qPCR dann jedoch nicht signifikant durch die Glukosebehandlung beeinflusst.

**Rasa1** Das außerdem untersuchte Gen des GTPase-aktivierenden Proteins RASA1 (*RAS p21 protein activator 1*)<sup>17</sup> war in der RNA-Sequenzierung durch Glukose um 21 % von 30,3 RPKM auf 23,9 RPKM in seiner Expression reduziert worden. Im Rahmen der RT-qPCR ließ sich ebenfalls eine Reduktion feststellen (−16 % unter Normierung auf *Tbp* und −12 % unter Normierung auf *Sdha*), allerdings war diese Effekte nicht signifikant.

### 3.3.6 RAF-Kinasen

**Übersicht** Die nächste Stufe des ERK-Signalwegs bilden nach den RAS-GTPasen die RAF-Kinasen (*Rapidly accelerated fibrosarcoma*), welche durch aktives, also GTP gebundenes, RAS an die Zellmembran rekrutiert und dadurch aktiviert werden (Samatar & Poulikakos, 2014). Es gibt drei Isoformen innerhalb der RAF-Kinasen-Familie, nämlich ARAF, BRAF und CRAF, auch RAF1 genannt, welche in der folgenden Gruppe (Abbildung 3.19) näher untersucht wurden.

**Araf** Die *Araf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase (Araf)*<sup>18</sup> hatte sich in der RNA-Sequenzierung mit einer Expression von 10,6 RPKM unter basalen Bedingungen und 11,1 RPKM unter 2,5 mM Glukose nicht relevant durch Glukose beeinflusst gezeigt. Die mittlere Steigerung der Expression in der RT-qPCR betrug normiert auf *Tbp* 23 %. Allerdings war die Messung mit einer großen Streuung behaftet, sodass diese Änderung als nicht signifikant anzusehen ist.

**Braf** Im Gegensatz hierzu hatte sich die *B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase (Braf)*<sup>19</sup> in der RNA-Sequenzierung durch Glukose von 4,7 RPKM auf 3,4 RPKM um

<sup>15</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20662> aufgerufen am 08.03.2022.

<sup>16</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20663> aufgerufen am 08.03.2022.

<sup>17</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/218397> aufgerufen am 08.03.2022.

<sup>18</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11836> aufgerufen am 17.02.2022.

<sup>19</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/109880> aufgerufen am 17.02.2022.

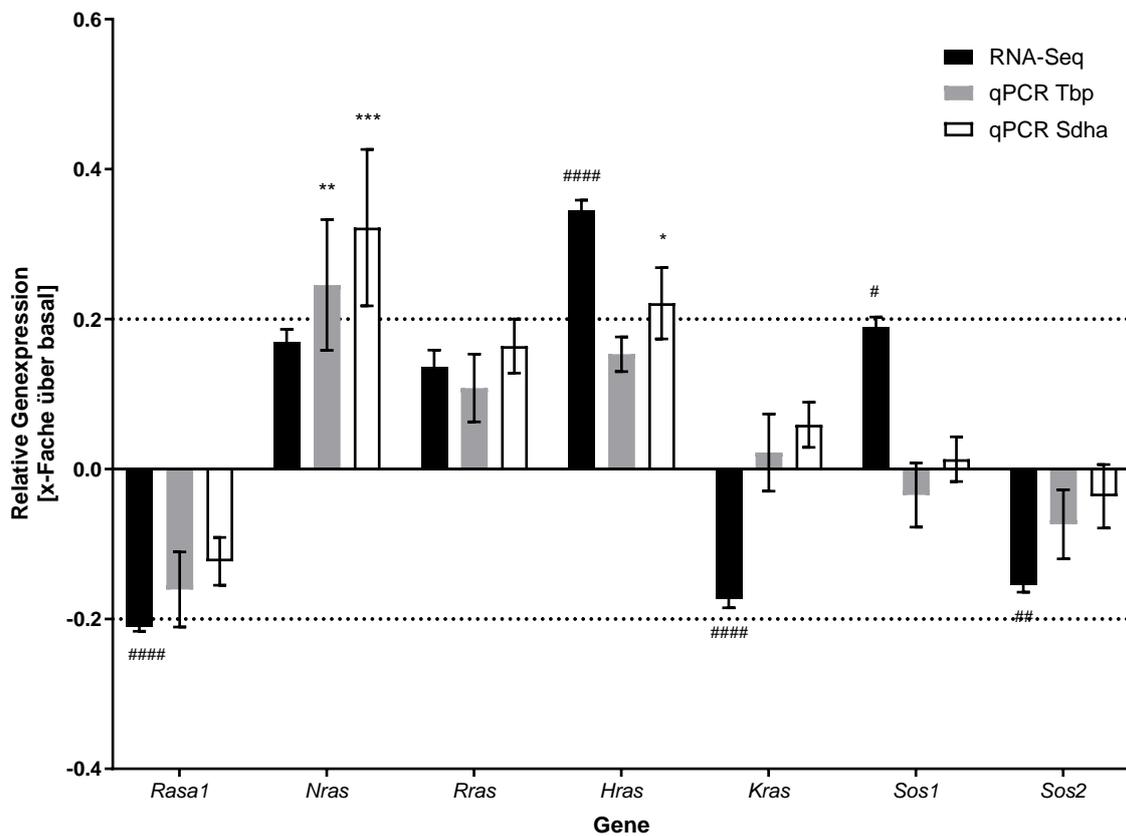


Abbildung 3.18: **Ras-GTPasen mit GEFs und GAP**

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Darstellung der relativen Expression der Ras-GTPasen *Hras*, *Kras*, *Nras* und *Rras* sowie der Guaninnukleotid-Austauschfaktoren, *Sos1* und *Sos2*, und des GTPase-aktivierenden Proteins *Rasa1*. In Schwarz die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Signifikante Unterschiede sind mit # markiert. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit Hilfe des Wald-Tests, False-Discovery-Rate korrigiert nach Benjamini und Hochberg,  $n = 3$ . In Grau die Ergebnisse der RT-qPCR normiert auf das Referenzgen *Tbp* und in Weiß auf das Referenzgen *Sdha*. Signifikante Unterschiede gemäß two-way ANOVA sind mit \* markiert,  $n = 3$ .

28 % reduziert gezeigt. Auch in der RT-qPCR zeigte sich eine Reduktion der Expression um 21 %, welche aufgrund einer hohen Streuung jedoch nicht signifikant war.

**Raf1** Das letzte Mitglied der RAF-Kinasen-Familie, die *Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase (Raf1 oder Craf)*<sup>20</sup> war durch Glukose in der RNA-Sequenzierung von 39 RPKM auf 30,3 RPKM um 22 % reduziert worden. Dieser Effekt ließ sich in der RT-qPCR nicht reproduzieren. Hier zeigte sich unter Normierung auf *Tbp* eine nicht signifikante Erhöhung um 8 %.

### 3.3.7 MEK und ERK

**Übersicht** Die Gene der vorletzten Stufe des ERK-Signalwegs vor ERK selbst, bilden MEK1 und 2, auch bekannt als *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1/2 (MAP2K1 und MAP2K2)*.

**Mek** Die *Map2k1* hatte sich in der RNA-Sequenzierung durch Glukose nicht relevant beeinflusst gezeigt, mit einer Änderung um 4 % von 19,8 RPKM auf 20,6 RPKM. Ganz anders verhielt sich hingegen die *Map2k2*, welche in der RNA-Sequenzierung unter Glukose einen signifikanten Anstieg ihrer Expression um 21 % von 57,8 RPKM auf 70,1 RPKM zeigte. Auf eine Untersuchung im Rahmen der RT-qPCR wurde aus Kapazitätsgründen verzichtet.

**Erk** Die *Erk1 (Extracellular Signal-regulated Kinase 1)*, auch bekannt als *Mitogen-Activated Protein Kinase 3 (Mapk3)*, war in der RNA-Sequenzierung durch Glukose in ihrer Expression um 24 % von 72,9 RPKM auf 90,7 RPKM signifikant gesteigert worden. Im Gegensatz hierzu hatte sich für die *Erk2 (Mapk1)* in der RNA-Sequenzierung mit einer Reduktion um weniger als 1 % von 38,2 RPKM auf 38,1 RPKM kein signifikanter Einfluss von Glukose auf die Expression feststellen lassen. Aus Kapazitätsgründen wurden die Genexpression von *Erk1* und *Erk2* nicht mittels RT-qPCR untersucht.

### 3.3.8 Serum Response Element (SRE)

**Übersicht** In den obigen Abschnitten wurde der Einfluss der Glukose auf die Genexpression der einzelnen am RAS-RAF-ERK-Signalweg beteiligten Proteine nachvollzogen. In den folgenden Abschnitten sollen nun die dem ERK-Signalweg nachgeschalteten Signalwege bzw. Transkriptionsfaktoren beleuchtet werden. Ein durch phosphoryliertes ERK wiederum phosphorylierter und damit aktivierter Transkriptionsfaktor ist ELK. Die drei Isoformen ELK1, ELK3 und ELK4 gehören zur Subfamilie der *Ternary Complex Factors (TCF)* der Familie der *Erythroblast Transformation Specific (ETS)*-Familie (Davis *et al.*, 2000). ELK bindet außerdem den ebenfalls als Transkriptionsfaktor bekannten *Serum Response Factor (SRF)*. Gemeinsam wirken insbesondere ELK1 und SRF synergistisch

<sup>20</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/110157> aufgerufen am 17.02.2022.

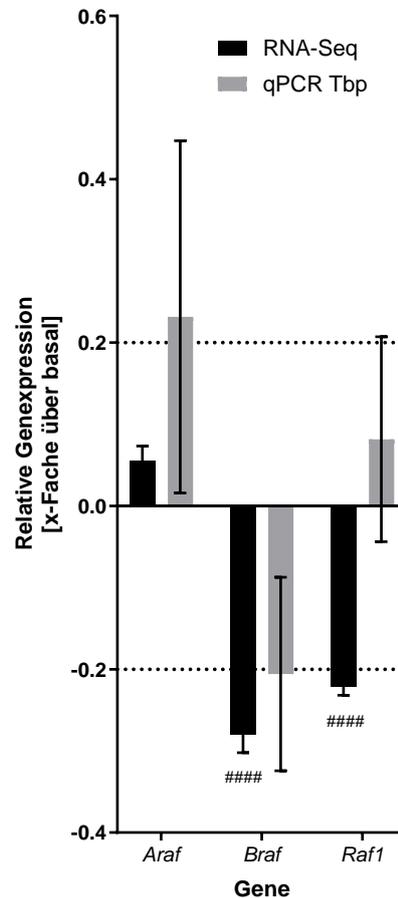


Abbildung 3.19: **RAF-Kinasen**

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Darstellung der relativen Expression der RAF-Kinasen *Araf*, *Braf* und *Craf* (*Ras1*). In Schwarz die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Signifikante Unterschiede sind mit # markiert. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit Hilfe des Wald-Tests, False-Discovery-Rate korrigiert nach Benjamini und Hochberg,  $n = 3$ . In Grau die Ergebnisse der RT-qPCR normiert auf das Referenzgen *Tbp* und in Weiß auf das Referenzgen *Sdha*. Signifikante Unterschiede gemäß two-way ANOVA sind mit \* markiert,  $n = 3$ .

und binden das *Serum Response Element*, einen Promotor vor verschiedenen Genen, u.a. von *C-fos* (Latinkić *et al.*, 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde nun der Einfluss von Glukose auf die Genexpression von SRF und ELK1, 3 und 4 untersucht (Abbildung 3.20).

**Srf** Der *Srf*<sup>21</sup> hatte sich in der RNA-Sequenzierung durch Glukose stark in seiner Genexpression gesteigert gezeigt. So stieg *Srf* hochsignifikant von 4,8 RPKM um 111 % auf 10,1 RPKM an. Dieser Effekt ließ sich jedoch durch die Daten der RT-qPCR nicht reproduzieren. Hier zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion der Expression um 10 % bei Normierung auf *Tbp* und um 4 % unter Berücksichtigung des Referenzgens *Sdha*.

**Elk1** *Elk1*<sup>22</sup> hatte in der RNA-Sequenzierung bei einer Expression von 13 RPKM sowohl unter basalen Bedingungen als auch unter 2,5 mM Glukose keine Änderung seiner Expression gezeigt. Ein ähnliches Bild ergab sich unter Normierung auf *Tbp* in der RT-qPCR, wo sich eine nicht signifikante Induktion von 6 % erkennen ließ. Unter zu Hilfenahme des Referenzgens *Sdha* zeigte sich dagegen eine Induktion von 13 %.

**Elk3** Ganz anders verhielt sich im Vergleich hierzu *Elk3*<sup>23</sup>. In der RNA-Sequenzierung ließ sich eine Induktion des Gens von 20,6 RPKM um 59 % auf 32,6 RPKM beobachten. Dies bestätigte sich in leicht abgeschwächter Form in der RT-qPCR. Unter Normierung auf *Tbp* ließ sich eine mittlere Induktion um 40 % und unter *Sdha* um 50 % beobachten.

**Elk4** Das letzte Mitglied der *Ternary Complex Family*, *Elk4*<sup>24</sup>, war in der RNA-Sequenzierung durch Glukose um 28 % von 4,9 RPKM auf 3,5 RPKM reduziert worden. Dieses Expressionsverhalten ließ sich in der RT-qPCR nicht reproduzieren. Normiert auf *Tbp* ergab sich keine signifikante Änderung der Expression. Unter Normierung auf *Sdha* zeigte sich dagegen eine Induktion der Expression unter 2,5 mM Glukose um 11 %.

### 3.3.9 cAMP Response Element (CRE)

**Übersicht** Ein weiterer durch ERK phosphorylierter und damit aktivierter Transkriptionsfaktor ist das *cAMP Response Element Binding-Protein* (CREB), das das *cAMP Response Element* (CRE), welches in den Promotorregionen diverser Gene zu finden ist, bindet (Davis *et al.*, 2000). Die Aktivität von CREB wird durch sogenannte *cAMP-regulated transcriptional co-activators* (CRTC) noch gesteigert (Altarejos & Montminy, 2011). In der folgenden Gruppe wurden die Gene von CREB1, 3 und 5 sowie von CRTC1 bis 3 zusammengefasst. Ergänzend hierzu wurden außerdem die Gene von CREB3L1 und 2, CREBBP, CREBL2, CREBRF und CREBZF untersucht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abbildung 3.21 zu sehen.

<sup>21</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20807> aufgerufen am 17.02.2022.

<sup>22</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13712> aufgerufen am 22.02.2022.

<sup>23</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13713> aufgerufen am 22.02.2022.

<sup>24</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13714> aufgerufen am 22.02.2022.

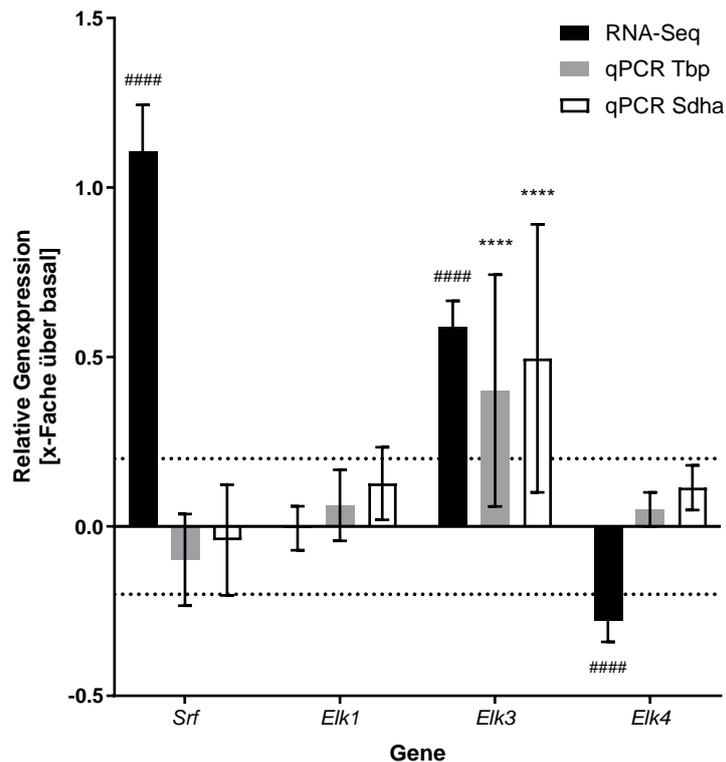


Abbildung 3.20: **SRE: *Srf* und *Elk***

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Darstellung der das *Serum Response Element* bindenden Transkriptionsfaktoren *Srf*, *Elk1*, *Elk3* und *Elk4*. In Schwarz die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Signifikante Unterschiede sind mit # markiert. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit Hilfe des Wald-Tests, False-Discovery-Rate korrigiert nach Benjamini und Hochberg,  $n = 3$ . In Grau die Ergebnisse der RT-qPCR normiert auf das Referenzgen *Tbp* und in Weiß auf das Referenzgen *Sdha*. Signifikante Unterschiede gemäß two-way ANOVA sind mit \* markiert,  $n = 3$ .

**Creb1** *Creb1*<sup>25</sup> hatte in der RNA-Sequenzierung eine Reduktion seiner Expression unter Glukose von 7,1 RPKM um 18 % auf 5,8 RPKM gezeigt. Dieser Effekt ließ sich in der RT-qPCR nicht reproduzieren. Hier zeigten sich sowohl unter Normierung auf *Tbp* als auch *Sdha* nur unwesentliche Veränderung der Expression.

**CREB3** CREB3 ist Namensgeber und Mitglied der als CREB3-Familie bezeichneten Gruppe von Transkriptionsfaktoren, zu denen neben CREB3 auch CREB3L1, CREB3L2, CREB3L3 und CREB3L4 (*CAMP Responsive Element Binding Protein 3 Like 1 - 4*) gehören. Ihnen ist gemein, dass sie in ihrer inaktiven Form in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert sind und nach Aktivierung zum Golgi-Apparat transportiert werden, wo der N-Terminus abgespalten wird, welcher dann schließlich im Nucleus seine Aktivität als Transkriptionsfaktor entfaltet (Sampieri *et al.*, 2019). In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsverhalten der ersten drei Mitglieder dieser Genfamilie untersucht.

**Creb3** *Creb3*<sup>26</sup> war in der RNA-Sequenzierung durch Glukose nicht wesentlich in seiner Expression verändert worden. In der RT-qPCR ließ sich bei Normierung auf *Tbp* eine leichte Reduktion seiner Expression um 14 % feststellen. Unter Normierung auf *Sdha* wiederum war ähnlich zur RNA-Sequenzierung keine wesentliche Veränderung der Expression festzustellen.

**Creb3l1** Für das zweite Mitglied der CREB3-Familie, dem *Creb3l1*<sup>27</sup>, war in der RNA-Sequenzierung eine nicht signifikante Steigerung der Expression von 5,0 RPKM um 25 % auf 6,2 RPKM zu beobachten. Auch im Rahmen der RT-qPCR ließ sich unter Normierung auf *Tbp* und *Sdha* kein signifikanter Einfluss von Glukose auf *Creb3l1* feststellen.

**Creb3l2** *Creb3l2*<sup>28</sup> hatte in der RNA-Sequenzierung eine Verringerung seiner Expression um 11 % von 10,9 RPKM auf 9,8 RPKM gezeigt. Im Rahmen der RT-qPCR wurde unter Normierung auf *Tbp* eine nicht signifikante Reduktion der Expression um 8 % und unter Normierung auf *Sdha* eine nicht signifikante Reduktion um 2 % festgestellt.

**Crebrf** Im Zusammenhang mit CREB3 wirkt auch das Protein CREBRF (*CREB3 Regulatory Factor*). Die CREB3-Familie wirkt als Transkriptionsfaktor nicht nur durch die Bindung des CRE, sondern ist auch in die Stressreaktion des endoplasmatischen Retikulums involviert, der sogenannten ungefalteten Protein-Antwort (*Unfolded Protein Response*), indem sie den entsprechenden Abschnitt der Promotorregion einiger Gene, das *Unfolded Protein Response Element* bindet. Der CREBRF wirkt hierbei als negativer Regulator, indem er CREB3 bindet und dessen Inaktivierung und Abbau fördert (Audas *et al.*

<sup>25</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12912> aufgerufen am 25.02.2022.

<sup>26</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12913> aufgerufen am 25.02.2022.

<sup>27</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/26427> aufgerufen am 25.02.2022.

<sup>28</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/208647> aufgerufen am 25.02.2022.

, 2008). Darüber hinaus besteht ein Zusammenhang zwischen bestimmten Allel-Varianten von CREBRF, die mit einem erhöhten Risiko für Adipositas, bei interessanterweise gleichzeitig erniedrigtem Risiko für Diabetes mellitus Typ 2 verbunden sind (Krishnan *et al.*, 2018). Diese nicht unwesentliche Bedeutung für den Glukosestoffwechsel spiegelte sich auch in den Daten der vorliegenden Arbeit wieder. So war *Crebrf*<sup>29</sup> in der RNA-Sequenzierung durch Glukose um 53 % von 14,5 RPKM auf 6,8 RPKM reduziert worden. Auch in der RT-qPCR zeigte sich eine Reduktion der Expression durch Glukose. Unter Normierung auf das Referenzgen *Tbp* betrug diese Reduktion 24 % und auf *Sdha* 19 %.

**Creb5** *Creb5*<sup>30</sup> war in der RNA-Sequenzierung durch Glukose stark reprimiert worden. Es zeigte sich eine Reduktion der Expression um 73 % von 1,6 RPKM auf 0,4 RPKM. Dieser Effekt ließ sich in der RT-qPCR bei Normierung auf *Tbp* mit einer Reduktion um 32 % abgeschwächt reproduzieren. Bei Normierung auf das Referenzgen *Sdha* zeigte sich eine Reduktion um 27 %. Allerdings war diese Änderung nicht signifikant.

**Crebbp** Das CREBBP (*CREB Binding Protein*)<sup>31</sup> bindet nicht nur CREB, sondern wirkt auch als Co-Aktivatoren diverser anderer Transkriptionsfaktoren, indem es u.a. Histone acetyliert. Außerdem wird ihm eine wichtige Rolle beim Wechsel zwischen Energiespeichern und -verbrauchen unterstellt (Yamauchi *et al.*, 2002). In der RNA-Sequenzierung war *Crebbp* in seiner Expression durch Glukose um 11 % von 5,5 RPKM auf 4,9 RPKM reduziert worden. In der RT-qPCR zeigte sich dagegen kein signifikanter Einfluss der Glukose auf *Crebbp*.

**Crebl2** Ebenfalls in dieser Gruppe wurde das Transkriptionsverhalten von *Crebl2*<sup>32</sup> untersucht. Auch CREBL2 wird die Fähigkeit zugeschrieben CRE zu binden und es gilt aufgrund seiner Deletion in unterschiedlichen Malignomen als mögliches Tumorsuppressorgen (Hoornaert *et al.*, 1998). In der RNA-Sequenzierung war *Crebl2* durch Glukose um 22 % von 3,2 RPKM auf 3,8 RPKM induziert worden. Auch in der RT-qPCR zeigte sich eine Induktion. Diese war mit 10 % unter Normierung auf *Tbp* und mit 16 % unter Normierung auf *Sdha* allerdings nicht signifikant.

**Crebzf** Ein weiteres Gen, das in dieser Gruppe untersucht wurde, ist *Crebzf* (*CREB/ATF BZIP Transcription Factor, Zhangfei*)<sup>33</sup>. Es wird vermutet, dass CREBZF die Aktivität des Tumorsuppressorgens p53 moduliert (López-Mateo *et al.*, 2012). Außerdem scheint CREBZF inhibitorisch auf CREB3 zu wirken (Misra *et al.*, 2005), weshalb ihm auch eine mögliche Rolle bei der Regulation der ungefalteten Protein-Antwort zugeschrieben wird (Zhang *et al.*, 2013). Nicht zuletzt scheint CREBZF auch STAT3 zu inhibieren und so

<sup>29</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/77128> aufgerufen am 25.02.2022.

<sup>30</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/231991> aufgerufen am 25.02.2022.

<sup>31</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12914> aufgerufen am 25.02.2022.

<sup>32</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/232430> aufgerufen am 25.02.2022.

<sup>33</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/233490> aufgerufen am 25.02.2022.

einen negativen Einfluss auf die Regeneration von Hepatozyten zu nehmen. (Hu *et al.* , 2020) Mit Hilfe der RNA-Sequenzierung konnte eine 25 %-ige Reduktion der Expression von *Crebzf* unter Glukose von 8,3 RPKM auf 6,3 RPKM nachgewiesen werden. In der RT-qPCR war ebenfalls eine Reduktion zu beobachten, die sogar noch stärker ausfiel. Unter Normierung auf *Tbp* betrug sie 35 % und unter Normierung auf *Sdha* 31 %.

**CRTC** Schließlich wurden noch die drei bekannten *cAMP-Regulated Transcriptional Co-Activators* (CRTC1-3) untersucht. cAMP und Kalzium-Signale führen zur Dephosphorylierung und damit Aktivierung von CRTC, welches daraufhin in den Nukleus verlagert wird und dort seine Funktion als Co-Aktivator von CREB wahrnimmt. CRTC1<sup>34</sup>, welches insbesondere im Hypothalamus exprimiert wird, spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Leptin-Signalen und der Begrenzung der Nahrungsaufnahme. CRTC2<sup>35</sup> wiederum vermittelt die durch Glukagon induzierte Glukoneogenese in der Leber und spielt eine Rolle bei der Entwicklung einer Insulinresistenz. CRTC3<sup>36</sup> schließlich wirkt in Fettzellen als Gegenspieler der Signalweiterleitung der Katecholamine und fördert damit Fettleibigkeit (Altarejos & Montminy, 2011).

***Crtc1*** In der RNA-Sequenzierung war *Crtc1* durch Glukose von 6,9 RPKM um 24 % auf 8,6 RPKM induziert worden. In der RT-qPCR ließ sich zwar die Tendenz einer Induktion reproduzieren, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant. Unter Normierung auf *Tbp* kam es zu einer insignifikanten Erhöhung um 9 %. Die Erhöhung der Expression unter Normierung auf *Sdha* um 16 % war ebenfalls nicht signifikant.

***Crtc2*** *Crtc2* war in der RNA-Sequenzierung insignifikant um 10 % von 15,6 RPKM auf 14,1 RPKM in seiner Expression vermindert worden. Ein gänzlich anderes Bild ergab sich für die Daten der RT-qPCR. Hier zeigte sich eine Induktion um 88 % bei Normierung auf *Tbp* und um 104 % bei Normierung auf *Sdha*.

***Crtc3*** Das am niedrigsten exprimierte *Crtc* war *Crtc3*, welches in der RNA-Sequenzierung eine Reduktion seiner Expression um 18 % von 5,6 RPKM auf 4,6 RPKM zeigte. Auch in der RT-qPCR war unter Normierung auf *Tbp* ein Rückgang der Expression von allerdings nur 15 % zu beobachten. Unter Normierung auf *Sdha* ließ sich zwar auch ein leichter Rückgang von 9 % beobachten, diese Beobachtung war jedoch nicht signifikant.

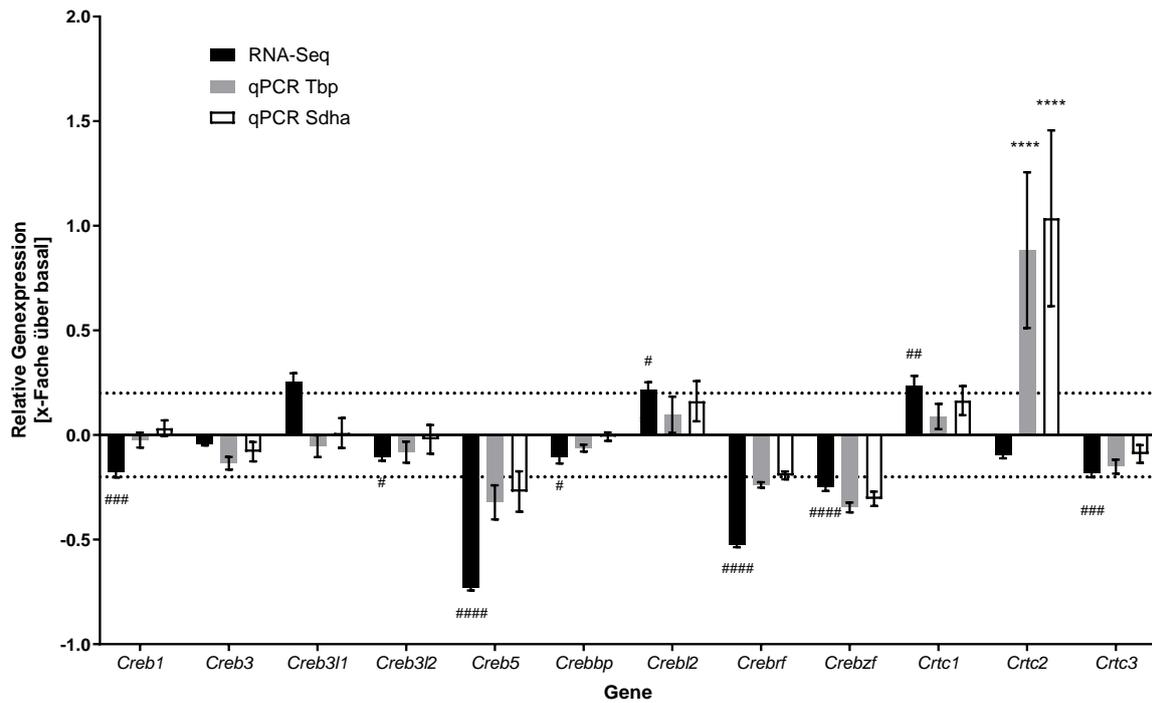
### 3.3.10 STAT-Signalweg

**Übersicht** Neben den oben beschriebenen Wegen der Signalübertragung, spielt auch der sogenannte JAK-STAT-Signalweg eine Rolle bei der durch IGF1 vermittelten Signale

<sup>34</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/382056> aufgerufen am 25.02.2022.

<sup>35</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/74343> aufgerufen am 25.02.2022.

<sup>36</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/70461> aufgerufen am 25.02.2022.

Abbildung 3.21: *Creb* und *Crtc*

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Darstellung der relativen Expression der *cAMP Response Element Binding-Proteine* (*Creb*) und der *CREB Regulated Transcription Coaktivatoren* (*Crtc*). In Schwarz die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Signifikante Unterschiede sind mit # markiert. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit Hilfe des Wald-Tests, False-Discovery-Rate korrigiert nach Benjamini und Hochberg,  $n = 3$ . In Grau die Ergebnisse der RT-qPCR normiert auf das Referenzgen *Tbp* und in Weiß auf das Referenzgen *Sdha*. Signifikante Unterschiede gemäß two-way ANOVA sind mit \* markiert,  $n = 3$ .

(Johnston *et al.* , 1995; Takahashi *et al.* , 1999). Der Grundsätzliche Aufbau des JAK-STAT-Signalwegs beginnt mit einem Rezeptor, der nach Stimulation durch einen Liganden JAK (Janus Kinase) bindet. Diese nicht-transmembranären Tyrosinkinase phosphorylieren den Rezeptor, was die Rekrutierung von STAT (Signal Transducer And Activator Of Transcription) begünstigt. Die rekrutierten STAT werden ihrerseits durch Phosphorylierung aktiviert, was dazu führt, dass sie Hetero- und Homodimere bilden. Diese Dimere wandern dann als Transkriptionsfaktoren in den Zellkern. Die STAT-Familie hat sieben Mitglieder, von denen folgende fünf in ihrer Genexpression in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden: STAT1, STAT2, STAT3, STAT5A und STAT5B. (Hu *et al.* , 2023) Eine Übersicht über die Ergebnisse findet sich in Abbildung 3.22.

**Stat1** *Stat1*<sup>37</sup> war in der RNA-Sequenzierung durch Glukose um 25 % von 7,2 RPKM auf 5,4 RPKM in seiner Expression reduziert worden. Dieser Effekt ließ sich in der RT-qPCR nicht nachweisen. Hier zeigte sich unter Normierung auf *Tbp* nur eine insignifikante Reduktion um 9 %.

**Stat2** *Stat2*<sup>38</sup> war in der RNA-Sequenzierung durch Glukose um 66 % von 10,0 RPKM auf 16,6 RPKM induziert worden. Die Tendenz einer Induktion ließ sich auch in der RT-qPCR zeigen. Die Steigerung der Expression von 30 % bei Normierung auf *Tbp* war jedoch statistisch nicht signifikant.

**Stat3** *Stat3*<sup>39</sup>, welches sich in der RNA-Sequenzierung noch unbeeinflusst durch Glukose präsentiert hatte (13,9 RPKM unter beiden Versuchsbedingungen), stellte sich in der RT-qPCR normiert auf *Tbp* als um 18 % induziert dar, wobei dieser Effekt nicht signifikant war.

**Stat5a** *Stat5a*<sup>40</sup> war in der RNA-Sequenzierung um 19 % unter Glukose von 4,3 RPKM auf 5,1 RPKM induziert. Die Daten der RT-qPCR normiert auf *Tbp* zeigten dagegen keine Signifikanz der Induktion von *stat5a* um 15 % unter Glukose.

**Stat5b** Ähnlich wie bei *Stat5a* verhielt es sich auch bei *Stat5b*<sup>41</sup>, welches in der RNA-Sequenzierung noch eine Induktion um 39 % von 4,0 RPKM auf 5,6 RPKM gezeigt hatte. Diese Tendenz ließ sich auch in der selben Größenordnung (38 % Induktion) in der RT-qPCR bei Normierung auf *Tbp* beobachten, allerdings war dieser Effekt abermals statistisch nicht signifikant.

---

<sup>37</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20846> aufgerufen am 17.02.2022.

<sup>38</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20847> aufgerufen am 17.02.2022.

<sup>39</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20848> aufgerufen am 17.02.2022.

<sup>40</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20850> aufgerufen am 17.02.2022.

<sup>41</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20851> aufgerufen am 17.02.2022.

### 3.3.11 SOCS-Familie (*Suppressor of Cytokine Signalling*)

**Übersicht** Der eben besprochene STAT-Signalweg wird wiederum durch eine Gruppe von Proteinen negativ reguliert, die sich *Suppressor Of Cytokine Signalling* (SOCS) nennen. Da sie zum Teil durch STAT induziert werden, tragen sie auch den Namen *STAT-Induced STAT Inhibitor*. Im Sinne einer negativen Feedback-Schleife regulieren sie die JAK-STAT-vermittelte Zytokin-Signaltransduktion (Yoshimura *et al.* , 2007). Neben diesen allgemeinen Funktionen, sind für einzelne Mitglieder dieser Gengruppe auch Zusammenhänge zur Insulin-Signaltransduktion und Entwicklung von Insulin-Resistenz beschrieben. So sollen SOCS1 und SOCS3 den Abbau von IRS1 und IRS2 mittels Ubiquitylierung fördern (Rui *et al.* , 2002). Von den insgesamt acht Mitgliedern der SOCS-Familie wurden in der vorliegenden Arbeit die Gene von SOCS1 bis SOCS6 untersucht. Eine Übersicht über die Ergebnisse findet sich in Abbildung 3.22.

**Socs1** Für das Gen *Socs1*<sup>42</sup> wurde in der Datenbank, mit deren Hilfe die Primer für die RT-qPCR designt wurden, zwei Transkriptionsvarianten angegeben, sodass Primer für beide Varianten bestellt und verwendet wurden. In der RNA-Analyse war nicht zwischen den beiden Transkriptionsvarianten unterschieden worden. Hier hatte *Socs1* durch Glukose eine Induktion der Expression von 2,4 RPKM um 32 % auf 3,1 RPKM gezeigt. Die Messungen der RT-qPCR unter Normierung auf *Tbp* waren mit einer großen Streuung behaftet, sodass sowohl für die Transkriptionsvariante 1 (*Socs1\_tv1*), als auch die Transkriptionsvariante 2 (*Socs1\_tv2*) die beobachtete Reduktion der Expression um 21 bzw. 19 % nicht signifikant war.

**Socs2** In der RNA-Sequenzierung hatte *Socs2*<sup>43</sup> im Gegensatz zu *Socs1* unter Glukose eine starke Reduktion seiner Expression um 77 % von 4,5 RPKM auf 1,1 RPKM gezeigt. Eine, wenn auch nicht so starke, Reduktion von 38 % ließ sich auch mit der RT-qPCR unter Normierung auf *Tbp* beobachten, welche allerdings nicht signifikant war.

**Socs3** Die 51 %-ige, im Rahmen der RNA-Sequenzierung unter Glukose nachgewiesene Induktion von *Socs3*<sup>44</sup> von 4,3 RPKM unter basalen Bedingungen auf 6,4 RPKM unter Glukose, ließ sich aufgrund einer großen Streuung der Messwerte in der RT-qPCR unter Normierung auf *Tbp* nicht nachweisen. Es zeigte sich lediglich die Tendenz einer Induktion um 17 %. Diese Veränderung war jedoch nicht signifikant.

**Socs4** *Socs4*<sup>45</sup> war sowohl in der RNA-Sequenzierung als auch in der RT-qPCR nicht signifikant in seiner Expression durch Glukose beeinflusst. In der RNA-Sequenzierung hatte sich die Tendenz einer Repression durch Glukose um 17 % von 8,5 RPKM auf 7,0 RPKM

<sup>42</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12703> aufgerufen am 26.09.2023.

<sup>43</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/216233> aufgerufen am 26.09.2023.

<sup>44</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12702> aufgerufen am 17.02.2022.

<sup>45</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/67296> aufgerufen am 17.02.2022.

gezeigt. In der RT-qPCR unter Normierung auf *Tbp* wiederum war eher eine Induktion um 6 % festzustellen, die aber, wie bereits erwähnt, ebenfalls nicht signifikant war.

**Socs5** In der RNA-Sequenzierung hatte *Socs5*<sup>46</sup> eine moderate Induktion seiner Expression unter Glukose um knapp 20 % von 8,5 RPKM auf 10,2 RPKM gezeigt. Eine noch stärkere Induktion, und zwar um 79 %, war in der RT-qPCR unter Normierung auf *Tbp* nachzuweisen. Zwar waren hier die Messungen mit einer größeren Streuung behaftet, die Änderung aber dennoch statistisch signifikant.

**Socs6** *Socs6*<sup>47</sup> war in der RNA-Sequenzierung in seiner Expression um 17 % von 9,3 RPKM auf 7,8 RPKM reduziert worden. Ein signifikanter Effekt der Glukose auf *Socs6* konnte dagegen in der RT-qPCR nicht nachgewiesen werden. Hier zeigte sich lediglich eine leichte Induktion um 9 %, die aufgrund einer großen Streuung der Messwerte ohne Signifikanz blieb.

**Socs7** *Socs7*<sup>48</sup> war in der RNA-Sequenzierung durch die Glukosebehandlung nicht signifikant um weniger als 1 % von 6,2 RPKM auf 6,1 RPKM reduziert worden. Aus Kapazitätsgründen und aufgrund der glukoseunabhängigen Expression wurde auf eine Validierung durch die RT-qPCR verzichtet.

**Cish** Das achte Mitglied der SOCS-Familie, *Cish* (*Cytokine Inducible SH2-containing Protein*)<sup>49</sup>, auch bekannt als *Socs*, hatte in der RNA-Sequenzierung sowohl unter basalen Bedingungen, als auch unter Glukose einen RPKM-Wert unter 1 aufgewiesen, und war somit als nicht relevant exprimiert angesehen worden. Folglich war auch auf eine nähere Untersuchung des Gens im Rahmen der RT-qPCR verzichtet worden.

### 3.3.12 RAB-Familie

**Übersicht** Weiter oben sind bereits einige Vertreter der RAS-Subfamilie, welche zur RAS-Superfamilie gehört, und deren Beteiligung am RAS-RAF-MEK-ERK-Signalweg besprochen worden. Eine weitere Subfamilie der RAS-Superfamilie ist die RAB-Familie. Es handelt sich hierbei ebenfalls um eine Gruppe von kleinen GTPasen. Die RAB-Familie ist insbesondere in den Vesikelverkehr eingebunden und spielt u.a. eine Rolle bei der Hormonsekretion und dem Transport von Neurotransmittern (Stenmark, 2009).

**Rab1a** RAB1A<sup>50</sup> ist nicht nur in den Vesikeltransport involviert, sondern spielt laut Thomas *et al.* (2014) auch eine Rolle bei der durch Aminosäuren vermittelten Aktivie-

<sup>46</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/56468> aufgerufen am 17.02.2022.

<sup>47</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/54607> aufgerufen am 17.02.2022.

<sup>48</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/192157> aufgerufen am 26.03.2024.

<sup>49</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/12700> aufgerufen am 26.03.2024

<sup>50</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/19324> aufgerufen am 22.02.2022.

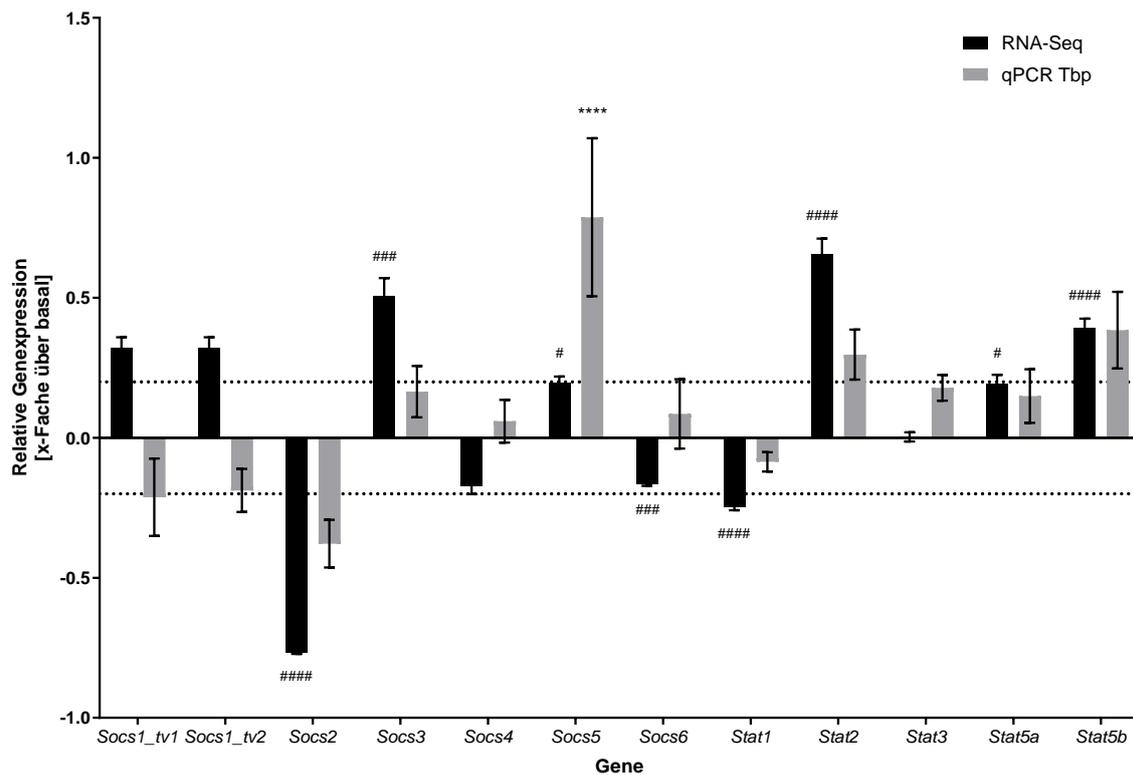


Abbildung 3.22: *Stat* und *Socs*

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Darstellung der relativen Expression der *Suppressor Of Cytokine Signalling (Socs)*- und der *Signal Transducer And Activator Of Transcription (Stat)*-Genfamilie. In Schwarz die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Signifikante Unterschiede sind mit # markiert. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit Hilfe des Wald-Tests, False-Discovery-Rate korrigiert nach Benjamini und Hochberg,  $n = 3$ . In Grau die Ergebnisse der RT-qPCR normiert auf das Referenzgen *Tbp*. Signifikante Unterschiede gemäß two-way ANOVA sind mit \* markiert,  $n = 3$ .

zung von mTORC1, und wirkt als Onkogen verschiedener Krebsformen. *Rab1a* war in der RNA-Sequenzierung durch Glukose in seiner Expression nicht signifikant verändert worden (+5 % von 73,5 RPKM auf 76,7 RPKM). In der RT-qPCR-Analyse zeigte sich *Rab1a* durch Glukose unter Normierung auf *Tbp* um 22 % und unter Normierung auf *Sdha* um 16 % in seiner Expression verstärkt. Diese Veränderungen waren jedoch nicht signifikant.

**Rab2a** Luo *et al.* (2015) zeigten, dass RAB2A neben seiner Rolle beim Vesikeltransport zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgiapparat die Inaktivierung von ERK1/2 verhindert und damit die Tumorgenese, insbesondere bei Brustkrebs, fördert. *Rab2a*<sup>51</sup> war durch die Glukosebehandlung in der RNA-Sequenzierung insignifikant um 10 % von 64,8 RPKM auf 71,4 RPKM in seiner Expression gesteigert worden. In der RT-qPCR-Analyse konnte bei Normalisierung auf *Tbp* eine insignifikante Induktion um 19 % festgestellt werden. Unter Normierung auf *Sdha* zeigte sich eine ebenfalls insignifikante Steigerung um 13 %.

**Rab2b** RAB2B ist neben anderen RAB-Proteinen für die spezifische und kompakte Morphologie des Golgiapparats verantwortlich (Aizawa & Fukuda, 2015). In der RNA-Sequenzierung hatte *Rab2b*<sup>52</sup> eine Reduktion seiner Expression durch Glukose um 30% von 6,8 RPKM auf 4,7 RPKM gezeigt. In der RT-qPCR dagegen war seine Expression beinahe unverändert, mit einer insignifikanten Repression um 6 % unter Normierung auf *Tbp* und einer Expressionsänderung unter 1 % unter Normierung auf *Sdha*.

**Rab3b** Lledo *et al.* (1993) beschrieben eine Beteiligung von RAB3B bei der Kalzium-vermittelten Exozytose. In der RNA-Sequenzierung hatte *Rab3b*<sup>53</sup> eine Induktion seiner Expression durch Glukose von 3,4 RPKM um 27 % auf 4,3 RPKM gezeigt. In der RT-qPCR war zwar im Mittel ebenfalls eine Induktion erkennbar (38 % bei Normierung auf *Tbp*, 46 % bei Normierung auf *Sdha*), diese war allerdings statistisch nicht signifikant.

**Rab5** RAB5 hat mehrere mit lateinischen Buchstaben versehene Isoformen, von denen in der vorliegenden Arbeit *Rab5b* und *Rab5c* untersucht wurden. RAB5 wird eine Rolle bei der Regulation der Endozytose und der Organisation des frühen Endosoms zugeschrieben (Bucci *et al.* , 1992).

**Rab5b** *Rab5b*<sup>54</sup> war in der RNA-Sequenzierung durch Glukose um 32 % von 46,8 RPKM auf 61,7 RPKM in seiner Expression induziert worden. Dieser Effekt ließ sich in der RT-qPCR nicht nachweisen. Hier zeigte sich bei Normierung auf *Tbp* lediglich eine insignifikante Steigerung der Expression um 17 % und bei Normierung auf *Sdha* um 13 %.

<sup>51</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/59021> aufgerufen am 22.02.2022.

<sup>52</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/76338> aufgerufen am 25.02.2022.

<sup>53</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/69908> aufgerufen am 25.02.2022.

<sup>54</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/19344> aufgerufen am 22.02.2022.

**Rab5c** *Rab5c*<sup>55</sup> war in der RNA-Sequenzierung nicht signifikant um 14 % von 69,7 RPKM auf 79,2 RPKM durch Glukose in seiner Expression gesteigert worden. Auch in der RT-qPCR waren keine signifikanten Änderungen der Expression festzustellen (*Tbp*: 9 %; *Sdha*: 5 %).

**Rab7b** Das Lysosom-assoziierte RAB7B spielt u.a. auch eine Rolle beim lysosomalen Abbau des proinflammatorischen TLR4 (Wang *et al.* , 2007). In der RNA-Sequenzierung hatte sich *Rab7b*<sup>56</sup> mit einer Erhöhung der Expression um 214 % von 1,9 RPKM auf 6,0 RPKM noch als deutlich durch Glukose induziert präsentiert. Allerdings gab es auch hier bei der RT-qPCR starke Schwankungen der Messwerte, sodass sich *Rab7b* nun nicht mehr durch Glukose beeinflusst zeigte (*Tbp*: -1 %; *Sdha*: +1 %).

**Rab10os** *Rab10os* (*RAB10, member RAS oncogene family, opposite strand*)<sup>57</sup>, dessen Funktion uncharakterisiert ist, hatte sich in der RNA-Sequenzierung als durch Glukose in seiner Expression um 23 % von 2,6 RPKM auf 2,0 RPKM vermindert präsentiert. Dieser Effekt war aufgrund großer Schwankungsbreiten der Messwerte in der RT-qPCR nicht nachweisbar (*Tbp*: -1 %; *Sdha*: -2 %).

**Rab13** RAB13 spielt eine wichtige Rolle bei der Insulin-induzierten Glukoseaufnahme in Muskelzellen. Nach Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor und Rekrutierung von IRS1 erfolgt die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase welche wiederum die AKT, auch bekannt als Proteinkinase B, phosphoryliert und damit aktiviert. AKT wiederum phosphoryliert und aktiviert damit AS160, auch bekannt als TBC1D4, einem GTPase-aktivierendem Protein, welches wiederum die kleine GTPase RAB13 aktiviert, was die Exozytose von GLUT4 an die äußere Zellmembran zur Folge hat (Sun *et al.* , 2010). Neben dieser wichtigen Rolle für den Glukosestoffwechsel ist RAB13 auch beim endozytotisch-vermittelten Recycling des für Tight Junctions wichtigen Proteins Occludin beteiligt (Morimoto *et al.* , 2005). *Rab13*<sup>58</sup> war in der RNA-Sequenzierung durch Glukose um 28 % von 12,6 RPKM auf 16,1 RPKM in seiner Expression induziert worden. Dieser Effekt ließ sich nur in seiner Tendenz in der RT-qPCR reproduzieren. Unter Normierung auf *Tbp* zeigte sich eine nicht signifikante Induktion von 11 %. Die 6 %-ige Induktion bei Normierung auf *Sdha* war ebenfalls nicht signifikant.

**Rab15** RAB15 ist ebenfalls an der Endozytose beteiligt und spielt außerdem eine Rolle beim Recycling von Rezeptoren (Zuk & Elferink, 2000). In der RNA-Sequenzierung war *Rab15*<sup>59</sup> durch Glukose um 42 % in seiner Expression reduziert worden. In der RT-qPCR-

<sup>55</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/19345> aufgerufen am 22.02.2022.

<sup>56</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/226421> aufgerufen am 22.02.2022.

<sup>57</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/74173> aufgerufen am 22.02.2022.

<sup>58</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/68328> aufgerufen am 22.02.2022.

<sup>59</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/104886> aufgerufen am 22.02.2022.

Analyse hingegen war die 16 %-ige Reduktion unter Normierung auf *Tbp* und die 19 %-ige Reduktion unter Normierung auf *Sdha* nicht signifikant.

**Rab20** Neben seiner Präsenz in Tumorzellen wie z.B. beim Pankreaskarzinom (Amillet *et al.*, 2006) spielt RAB20 außerdem eine Rolle beim vesikulären Transport des Proteins Connexin43, welches einen wichtigen Bestandteil von Gap Junctions ausmacht. Kim *et al.* (2020) hatten unter hohen Glukosekonzentrationen (30 mM) eine Hochregulation von RAB20 beobachtet, was in einer verminderten Exposition von Connexin43 auf der Zelloberfläche resultierte und vermutlich zu einer verschlechterten interzellulären Kommunikation über Gap Junctions führt. *Rab20*<sup>60</sup> hatte in der RNA-Sequenzierung eine Reduktion seiner Expression unter Glukose um 48 % von 5,0 RPKM auf 2,5 RPKM gezeigt. Eine Repression ließ sich in einigen, allerdings nicht in allen untersuchten Proben der RT-qPCR-Analyse nachweisen, sodass sich in der Gesamtschau keine Aussage zum Expressionsverhalten von *Rab20* aus den RTqPCR-Daten ableiten lässt.

**Rab21** RAB21 ist ebenfalls an der Endozytose und der Organisation des Endosoms beteiligt. Insbesondere über den endosomalen Vesikeltransport von Integrinen, welche eine wichtige Rolle bei Zell-Matrix-Kontakten spielen, wird RAB21 eine regulative Rolle in Bezug auf die Zelladhäsion zugesprochen (Pellinen *et al.*, 2006). *Rab21*<sup>61</sup> war sowohl in der RNA-Sequenzierung als auch in der RT-qPCR-Analyse nicht signifikant durch Glukose in seiner Expression beeinflusst. In der RNA-Sequenzierung zeigte sich eine insignifikante Steigerung der Expression um 14 % von 33,9 RPKM auf 38,6 RPKM. In der RT-qPCR war unter Normierung auf *Tbp* eine insignifikante Steigerung der Expression um 2 % und unter Normierung auf *Sdha* eine ebenfalls insignifikante Reduktion um 3 % zu beobachten.

**Rab24** RAB24 ist insbesondere am intrazellulären Prozess der Autophagie beteiligt (Munafó & Colombo, 2002). Seitz *et al.* (2019) konnten außerdem eine vermehrte Expression von RAB24 in Hepatozyten von Patienten mit Nicht-alkoholischer Fettleber feststellen. Im Mausmodell zeigte sich darüber hinaus eine Verminderung der Glukose- und Cholesterinwerte durch leberspezifische Inhibition von RAB24. *Rab24*<sup>62</sup> war in der RNA-Sequenzierung durch Glukose um 34 % von 26,7 RPKM auf 17,5 RPKM in seiner Expression reduziert worden. Zwar ließ sich auch in der RT-qPCR die Tendenz einer Reduktion erkennen, dieser Effekt war allerdings mit 17 % unter Normierung auf *Tbp* und 21 % unter Normierung auf *Sdha* deutlich geringer und nicht signifikant.

**Rab34** RAB34 ist an der Kontrolle der Phagosomenreifung und der lysosomalen Abtötung von phagozytierten Mykobakterien beteiligt (Kasmapour *et al.*, 2012). *Rab34*<sup>63</sup> war sowohl in der RNA-Sequenzierung, in der sich eine insignifikante Steigerung um 7 % von

<sup>60</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/19332> aufgerufen am 22.02.2022.

<sup>61</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/216344> aufgerufen am 22.02.2022.

<sup>62</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/19336> aufgerufen am 22.02.2022.

<sup>63</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/19376> aufgerufen am 22.02.2022.

33,9 RPKM auf 36,3 RPKM zeigte, als auch in der RT-qPCR, in der sich eine insignifikante Reduktion um 8 % unter Normierung auf *Tbp* und um 13 % unter Normierung auf *Sdha* beobachten ließ, nicht durch Glukose in seiner Expression beeinflusst worden.

**Rab39b** Dem durch RAB39b vermittelten Vesikeltransport wird eine essenzielle Rolle bei der Reifung von Neuronen, der Ausbildung von Synapsen und der geistigen Entwicklung zugesprochen (Giannandrea *et al.*, 2010). *Rab39b*<sup>64</sup> war sowohl in der RNA-Sequenzierung als auch in der RT-qPCR durch Glukose in seiner Expression vermindert. In der RNA-Sequenzierung betrug die Reduktion 70 % (von 14,1 RPKM auf 4,1 RPKM), während in der RT-qPCR nur noch eine Reduktion von 41 % unter Normierung auf *Tbp* und von 43 % unter Normierung auf *Sdha* nachweisbar war. Diese Expressionsveränderungen stellten sich jedoch als nicht signifikant heraus.

**Rabep1** *RAB GTPase Binding Effector Protein 1* (RABEP1), auch bekannt als *Rabaptin-5*, ist in den Transport von Membranproteinen vom Golgiapparat zur Plasmamembran von Zilien involviert (Kim *et al.*, 2014). Außerdem korrelieren Genvarianten von RABEP1 mit Glukosewerten und es wird eine Beteiligung an der Regulation des Stoffwechsels vermutet (Delacrétaz *et al.*, 2017). *Rabep1*<sup>65</sup> war in seiner Expression in der RNA-Sequenzierung durch Glukose um 28 % von 23,0 RPKM auf 16,6 RPKM reduziert worden. In der RT-qPCR zeigte sich *Rabep1* allerdings nur insignifikant um 10 % bei Normierung auf *Tbp* und um 15 % bei Normierung auf *Sdha* reprimiert, sodass in der RT-qPCR kein Glukose-Effekt auf *Rabep1* nachgewiesen werden konnte.

### 3.3.13 TBC1D-Familie

**Übersicht** In der folgenden Gruppe wurden die Gene ausgewählter Proteine der TBC-Domänen-Familie im Hinblick auf ihre Beeinflussbarkeit durch die Medium-Glukosekonzentration untersucht (Abbildung 3.24). Die Mitglieder dieser Proteinfamilie verdanken ihren Namen (TBC1D) einer gemeinsamen Domäne, die zuerst in den drei Proteinen TRE-2, BUB2 und CDC16 entdeckt wurde (Richardson & Zon, 1995). Die Vertreter der TBC1D-Familie wirken überwiegend als sogenannte GTPase-aktivierende Proteine (GAP) für die eben besprochenen RAB-GTPasen, indem sie deren GTP-Hydrolyserate erhöhen (Bernards, 2003; Pan *et al.*, 2006).

**Tbc1d4** TBC1D4, auch bekannt als AS160 (*Akt substrate of 160 kDa*), ist insbesondere wichtig für die durch AKT vermittelte, Insulin-induzierte Glukoseaufnahme in Skelettmuskelzellen und bewirkt hier in Verbindung mit den bereits oben beschriebenen RAB-GTPasen die Exozytose des transmembranären Glukosetransporters GLUT4 (Sakamoto & Holman, 2008). *Tbc1d4*<sup>66</sup> war in der RNA-Sequenzierung durch die Glukosebehandlung

<sup>64</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/67790> aufgerufen am 22.02.2022.

<sup>65</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/54189> aufgerufen am 22.02.2022.

<sup>66</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/210789> aufgerufen am 22.02.2022.

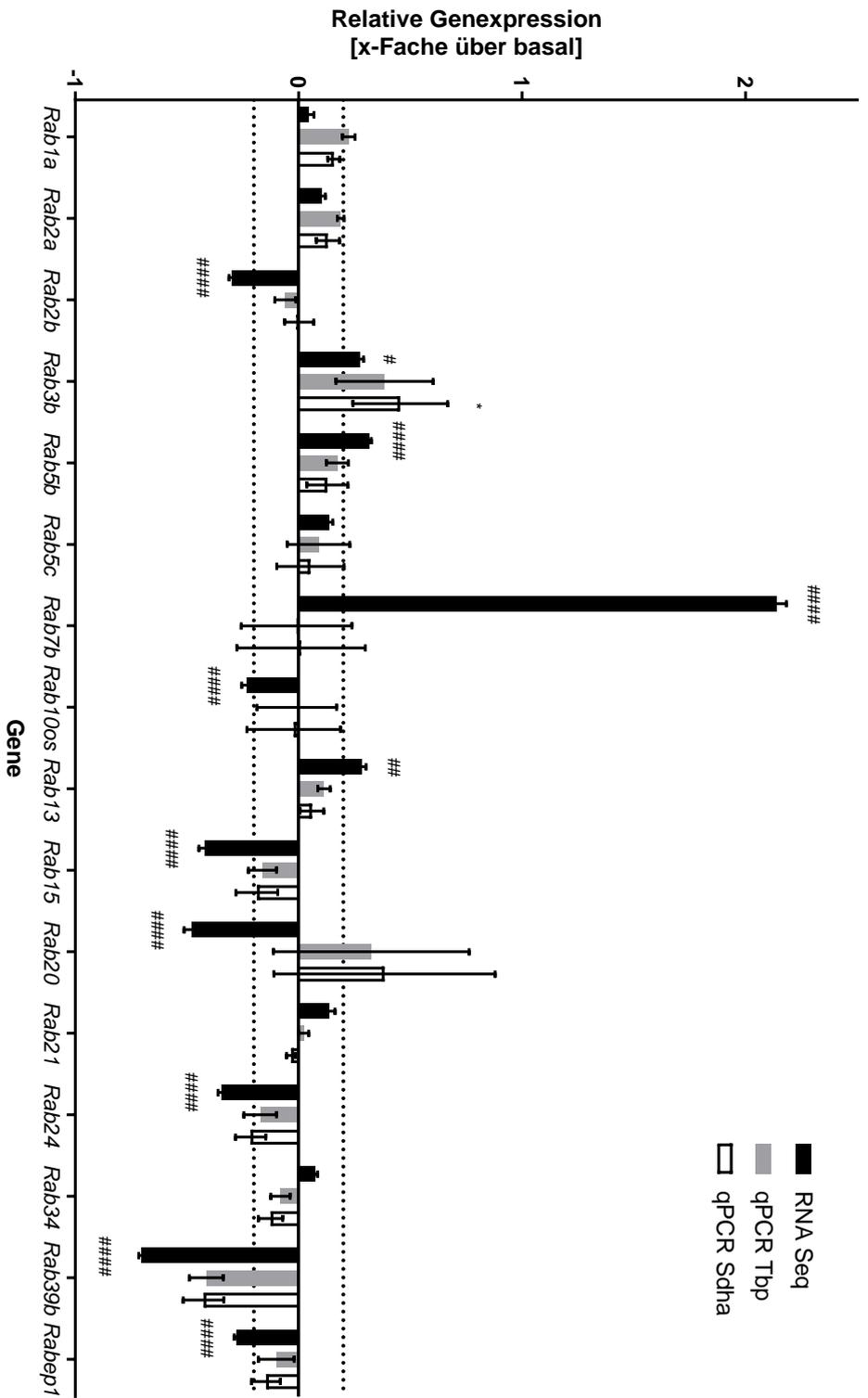


Abbildung 3.23: RAB-GTPasen

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Darstellung der relativen Expression der RAB-GTPasen-Genfamilie. In Schwarz die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Signifikante Unterschiede sind mit # markiert. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit Hilfe des Wald-Tests, False-Discovery-Rate korrigiert nach Benjamini und Hochberg,  $n = 3$ . In Grau die Ergebnisse der RT-qPCR normiert auf das Referenzgen *Tbp* und in Weiß auf das Referenzgen *Saha*. Signifikante Unterschiede gemäß two-way ANOVA sind mit \* markiert,  $n = 3$ .

deutlich um 90% von 1,3 RPKM auf 2,4 RPKM induziert worden. In der RT-qPCR-Analyse zeigte sich eine Induktion um 29 % unter Normierung auf *Tbp* und um 37 % unter Normierung auf *Sdha*.

***Tbc1d7*** TBC1D7 bildet mit dem *Tuberous Sclerosis Complex Subunit 1* und *2* (TSC1, TSC2) einen Komplex, welcher bei schlechten Wachstumsbedingungen, wie niedrige Nährstoffverfügbarkeit, wiederum mTORC1 hemmt und damit Zellwachstum unter schlechten Wachstumsbedingungen verhindert sowie die Autophagie fördert. Zusätzlich wirken AKT hemmend und AMPK aktivierend auf diesen TSC-TBC-Komplex (Dibble *et al.*, 2012). *Tbc1d7*<sup>67</sup> hatte in der RNA-Sequenzierung eine Reduktion seiner Expression um 19 % von 11,0 RPKM auf 8,9 RPKM gezeigt. In der RT-qPCR-Analyse zeigte sich zwar eine leichte Reduktion von 15 % unter Normierung auf *Tbp* und von 10 % unter Normierung auf *Sdha*, allerdings waren diese Veränderungen statistisch nicht signifikant.

***Tbc1d9b*** TBC1D9B ist das GTPase-aktivierende Protein von RAB11A und zusammen mit diesem an der Regulation des endosomalen Vesikeltransports beteiligt. Ihm wird eine Rolle bei der Ausbildung und Funktion von Synapsen zugeschrieben (Hironori *et al.*, 2019). *Tbc1d9b*<sup>68</sup> zeigte sowohl in der RNA-Sequenzierung (von 15,7 RPKM um - 8 % auf 14,5 RPKM) als auch in der qPCR-Analyse (-16 % unter *Tbp*, -10 % unter *Sdha*) keine signifikante Veränderung durch die Glukosebehandlung.

***Tbc1d10a*** TBC1D10A ist eines von drei GTPase-aktivierenden Proteinen (TBC1D10A-C) der GTPase RAB35. Zusammen wirken diese beiden Proteine regulierend auf die exosomale Sekretion in Oligodendrozyten (Hsu *et al.*, 2010). *Tbc1d10a*<sup>69</sup> hatte in der RNA-Sequenzierung nur eine insignifikante Steigerung seiner Expression von 4,6 RPKM um 11 % auf 5,2 RPKM gezeigt. Im Rahmen der RT-qPCR wurden ebenfalls nur insignifikante Veränderungen registriert. Unter Normierung auf *Tbp* zeigte sich eine leichte Reduktion der Expression um 11 % und unter Normierung auf *Sdha* um 5 %.

***Tbc1d15*** TBC1D15 gilt als das GAP von RAB7 und soll in diesem Zusammenhang die Morphologie der Lysosomen sowie die Abhängigkeit der Zelle von Wachstumsfaktoren beeinflussen (Peralta *et al.*, 2010). Außerdem wird dem GAP-GTPase-Paar aus TBC1D15 und RAB7 eine ähnliche Funktion wie TBC1D4 und RAB13 zugeschrieben, da es ebenfalls für die Exozytose von GLUT4 an die Zelloberfläche verantwortlich sein soll (Wu *et al.*, 2019). *Tbc1d15*<sup>70</sup> hatte in der RNA-Sequenzierung eine Reduktion seiner Expression um 41 % von 67,2 RPKM auf 39,4 RPKM gezeigt. In der RT-qPCR-Analyse war ebenfalls eine Reduktion der Expression zu beobachten. Unter Normierung auf *Tbp* betrug diese 24 % und unter *Sdha* 20 %, wobei letztere nicht signifikant war.

<sup>67</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/67046> aufgerufen am 22.02.2022.

<sup>68</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/76795> aufgerufen am 22.02.2022.

<sup>69</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/103724> aufgerufen am 22.02.2022.

<sup>70</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/66687> aufgerufen am 22.02.2022.

***Tbc1d16*** TBC1D16 gilt als das GAP von RAB4A und soll in diesem Zusammenhang am Recycling des Transferrinrezeptors und an der EGFR-vermittelten Signaltransduktion beteiligt sein (Goueli *et al.*, 2012). Es wirkt außerdem als GAP für RAB5C, das die Replikation eines bestimmten Retrovirus hemmt (Yan *et al.*, 2021). *Tbc1d16*<sup>71</sup> war in der RNA-Sequenzierung eine deutliche Induktion um 53 % von 3,2 RPKM auf 4,9 RPKM nachgewiesen worden. Die Tendenz der Induktion ließ sich auch in der RT-qPCR auf etwas niedrigerem Niveau erkennen. Unter Normierung auf das Referenzgen *Tbp* ergab sich eine Induktion um 31 % und unter Normierung auf *Sdha* um 40 %.

***Tbc1d22a*** TBC1D22A gilt als GTPase-aktivierendes Protein für RAB33 und soll bei der Replikation von Viren eine Rolle spielen (Greninger *et al.*, 2013). *Tbc1d22a*<sup>72</sup> hatte in der RNA-Sequenzierung eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion seiner Expression um 9 % von 10,1 RPKM auf 9,2 RPKM gezeigt. In der RT-qPCR-Analyse zeigte sich eine etwas stärkere, aber ebenfalls insignifikante Reduktion um 18 % bei Normierung auf *Tbp* und um 13 % bei Normierung auf *Sdha*.

***Tbc1d23*** TBC1D23 ist bislang keinem spezifischen RAB-Protein als GTPase-aktivierendes Protein zugeordnet worden, was möglicherweise an einer katalytischen Inaktivität von TBC1D23 liegen könnte. Es scheint jedoch eine wichtige Rolle beim Vesikeltransport vom Endosom zum Golgiapparat zu spielen, indem es bestimmte Golgine des trans-Golgi und spezifische Komplexe auf den von Endosomen stammenden Vesikeln bindet (Shin *et al.*, 2017). Darüber hinaus führen Mutationen von TBC1D23 zu einer bestimmten Form der Pontocerebellären Hypoplasie, die im Gegensatz zur typischen Form nicht durch eine fortschreitende Neurodegeneration gekennzeichnet ist (Marin-Valencia *et al.*, 2017). *Tbc1d23*<sup>73</sup> zeigte wie in der RNA-Sequenzierung (−10 % von 7,9 RPKM auf 7,2 RPKM) so auch in der RT-qPCR-Analyse (*Tbp*: −4 %; *Sdha*: +2 %) keine signifikante Beeinflussung durch die Glukosebehandlung.

***Tbc1d24*** TBC1D24 spielt eine wichtige Rolle bei der Endozytose sowie der Organisation des Endosoms in Neuronen und ist damit essenziell für die neuronale Signalweiterleitung. Mutationen von TBC1D24 sind mit verschiedenen Epilepsieformen assoziiert (Finelli *et al.*, 2018). *Tbc1d24*<sup>74</sup> war sowohl in der RNA-Sequenzierung als auch in der RT-qPCR-Analyse nicht wesentlich verändert. In der RNA-Sequenzierung zeigte sich eine insignifikante Repression durch Glukose um 4 % von 7,2 RPKM auf 6,9 RPKM. Auch in der RT-qPCR zeigte sich nur eine unwesentliche und statistisch insignifikante Repression von 6 % unter Normierung auf *Sdha* und von 12 % unter Normierung auf *Tbp*.

<sup>71</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/207592> aufgerufen am 22.02.2022.

<sup>72</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/223754> aufgerufen am 22.02.2022.

<sup>73</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/67581> aufgerufen am 22.02.2022.

<sup>74</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/224617> aufgerufen am 22.02.2022.

***Tbc1d31*** TBC1D31 ist u.a. am Zentrosom lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Zilien. Mutationen von TBC1D31 können zu Störungen der Embryonalentwicklung führen (Senatore *et al.*, 2021). *Tbc1d31*<sup>75</sup> war in der RNA-Sequenzierung in seiner Expression durch die Glukosebehandlung deutlich um 62 % von 22,7 RPKM auf 8,7 RPKM reduziert worden. Auch in der RT-qPCR zeigte sich eine deutliche Reduktion. Sie betrug unter Normierung auf *Tbp* 55 % und unter Normierung auf *Sdha* 53 %.

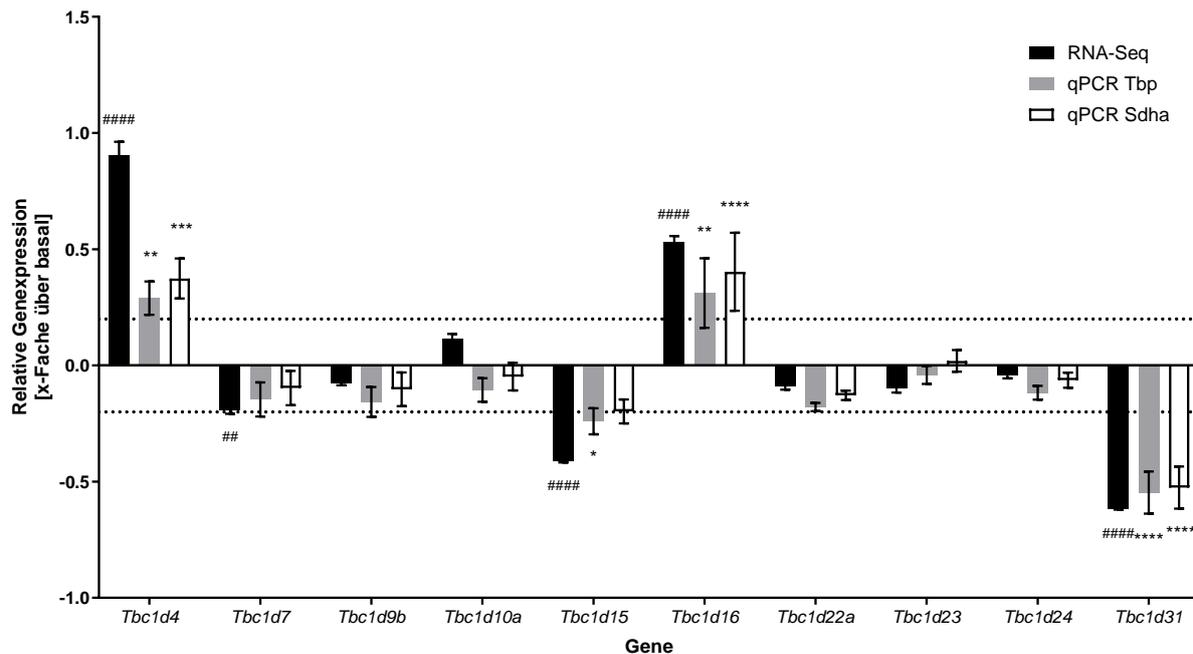


Abbildung 3.24: **TBC1D-Familie von GTPase-aktivierenden Proteinen**

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Darstellung der relativen Expression der Gene der TRE-2/BUB2/CDC16-Domänen-Familie. In Schwarz die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Signifikante Unterschiede sind mit # markiert. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit Hilfe des Wald-Tests, False-Discovery-Rate korrigiert nach Benjamini und Hochberg,  $n = 3$ . In Grau die Ergebnisse der RT-qPCR normiert auf das Referenzgen *Tbp* und in Weiß auf das Referenzgen *Sdha*. Signifikante Unterschiede gemäß two-way ANOVA sind mit \* markiert,  $n = 3$ .

### 3.3.14 RAP und RAP-GEFs

**Übersicht** Die RAP-Familie gehört zur Superfamilie der RAS-GTPasen und besteht aus fünf Mitgliedern: RAP1A, RAP1B, RAP2A, RAP2B und RAP2C. Von diesen fünf wurden

<sup>75</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/210544> aufgerufen am 22.02.2022.

die letzten drei sowie die drei RAP-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren RAPGEF1-3 in ihrer Genexpression untersucht (Abbildung 3.25).

**Rap2a** RAP2A wird u.a. eine Rolle bei der Ausbildung von Dendriten in Neuronen zugeschrieben. (Kawabe *et al.*, 2010). Außerdem beobachteten Gloerich *et al.* (2012), dass RAP2A in Darmzellen in die Ausbildung des Bürstensaums in Abhängigkeit von der Zellpolarität involviert ist. Im Rahmen der RNA-Sequenzierung hatte das *RAS Related Protein 2A (Rap2a)*<sup>76</sup> eine deutliche Induktion seiner Expression durch Glukose um 114 % von 6,5 RPKM auf 13,9 RPKM gezeigt. Auch in der RT-qPCR ließ sich eine Induktion durch Glukose nachweisen. Allerdings war diese deutlich geringer und lag unter Normierung auf *Tbp* bei 27 % und unter Normierung auf *Sdha* bei 45 %.

**Rap2b** RAP2B wird eine Rolle in verschiedensten zellulären Prozessen zugeschrieben, wie z.B. bei der Proliferation oder Zellmigration, weswegen es auch als Onkogen angesehen wird (Zhu *et al.*, 2016). Im Rahmen der RNA-Sequenzierung hatte sich für *Rap2b*<sup>77</sup> eine Induktion der Expression um 48 % von 9,7 RPKM auf 14,5 RPKM feststellen lassen. In der RT-qPCR zeigte sich unter Normierung auf *Tbp* eine Induktion um 24 % und unter Normierung auf *Sdha* um 46 %.

**Rap2c** RAP2C ist das “jüngste”, d.h. zuletzt beschriebene, Mitglied der RAP-Familie und wurde u.a. in verschiedenen hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen (Paganini *et al.*, 2006). Es spielt außerdem eine Rolle bei Brustkrebs, wo es den MAPK-Signalweg aktiviert und zur Phosphorylierung von ERK führt (Zhu *et al.*, 2020). *Rap2c*<sup>78</sup> hatte sich in der RNA-Sequenzierung als nicht wesentlich durch Glukose beeinflusst gezeigt (−2 % von 13,1 RPKM auf 12,8 RPKM). In der RT-qPCR zeigte sich unter Normierung auf *Tbp* keine Änderung der Expression und unter Normierung auf *Sdha* nur eine statistisch insignifikante Steigerung der Expression um 11 %.

**Rapgef1** RAPGEF1 (*Rap Guanine Nucleotide Exchange Factor 1*, auch bekannt als C3G) aktiviert RAP1 (Gotoh *et al.*, 1995) und wirkt damit auch aktivierend auf den MAPK-Weg (Vossler *et al.*, 1997). Neben dem bereits besprochenen Phosphatidylinositol-3-Kinase-Weg vermittelt noch ein zweiter Signalweg die Insulin-induzierte Exozytose von GLUT4. Nämlich der sogenannte CAP/TC10-Weg. An diesem ist neben C3G/RAPGEF1 außerdem TC10, auch bekannt als RHOQ, beteiligt (Hong *et al.*, 2009). Während in der RNA-Sequenzierung für den *Rapgef1*<sup>79</sup> kein signifikanter Einfluss von Glukose auf dessen Expression nachgewiesen werden konnte, da die Steigerung der Expression um 10 % von 13,4 RPKM auf 14,7 RPKM statistisch nicht signifikant war, waren die Ergebnisse der RT-qPCR uneindeutig. Für die Normierung auf *Tbp* ergab sich eine Reduktion der Expression

<sup>76</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/76108> aufgerufen am 03.03.2022.

<sup>77</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/74012> aufgerufen am 03.03.2022.

<sup>78</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/72065> aufgerufen am 03.03.2022.

<sup>79</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/107746> aufgerufen am 03.03.2022.

um 28 %. Bei Normierung auf *Sdha* wiederum zeigte sich zwar eine Reduktion um 18 %, diese war jedoch statistisch nicht signifikant.

**Rapgef2** Wie das eben beschriebene RAPGEF1 wirkt auch RAPGEF2 aktivierend auf RAP1. Über GPCR vermittelte Erhöhungen von cAMP sollen zu einer Aktivierung von RAPGEF2 führen, welches dann wiederum über RAP1, RAF und MEK ERK aktiviert (Emery *et al.*, 2013). Dies impliziert eine Beteiligung an diversen wichtigen zellulären Vorgängen, wie der embryonalen Hämatopoese (Satyanarayana *et al.*, 2010) oder der Entwicklung des Gehirns (Bilasy *et al.*, 2011), um nur zwei Beispiele zu nennen. *Rapgef2*<sup>80</sup> war sowohl in der RNA-Sequenzierung, in welcher nur eine insignifikante Repression um 10 % von 3,7 RPKM auf 3,4 RPKM zu beobachten war, als auch in der RT-qPCR-Analyse, im Rahmen derer unter Normierung auf *Tbp* eine insignifikante Veränderung von -1 % und unter Normierung auf *Sdha* von +8 % festgestellt wurde, nicht wesentlich durch Glukose in seiner Expression beeinflusst worden.

**Rapgef3** RAPGEF3, auch bekannt als Exchange Protein Directly Activated By cAMP Isoform 1 (EPAC1), ist an der Bildung von sogenannten Signalosomen beteiligt. Weitere Teile dieser Signalosomen bilden u.a. PDE4D3, PKA und ERK5. In diesem Zusammenhang wird RAPGEF3 auch eine Rolle bei Stressreaktionen auf zellulärer Ebene zugesprochen (Banerjee & Cheng, 2015). In der RNA-Sequenzierung war *Rapgef3*<sup>81</sup> um 39 % von 2,6 RPKM auf 3,7 RPKM in seiner Expression durch Glukose gesteigert worden. In der RT-qPCR dagegen ließ sich kein eindeutiger Effekt nachweisen. Unter Normierung auf *Tbp* zeigte sich eine insignifikante Verringerung um 16 % und unter Normierung auf *Sdha* um 6 %.

### 3.3.15 RHO und RHO-GEFs

**Übersicht** Eine weitere Untergruppe der RAS-Superfamilie bildet neben der RAB- und der RAP-Familie, die sogenannte RHO-Familie (*Ras Homolog Family*), zu der 20 kleine GTPasen gezählt werden. Unmittelbar reguliert werden diese, wie auch die anderen Mitglieder der RAS-Superfamilie, durch eigene GTPase aktivierende Proteine (GAP) und Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF). Sie sind an vielen zellulären Prozessen beteiligt und spielen u.a. für die Regulation des Zytoskeletts und in diesem Zusammenhang für die Beweglichkeit von Zellen eine Rolle (Mosaddeghzadeh & Ahmadian, 2021).

**Rhoa** RHOA reguliert über die Förderung der Aktinpolymerisation das Zytoskelett, die Membranprotrusion und Zellkontraktilität, und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Zellmigration. Diese ist nicht nur von zentraler Bedeutung für Immunzellen, um zum Ort einer Infektion zu gelangen und Pathogene zu phagozytieren, sondern auch für Tumorzellen

<sup>80</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/76089> aufgerufen am 03.03.2022.

<sup>81</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/223864> aufgerufen am 03.03.2022.

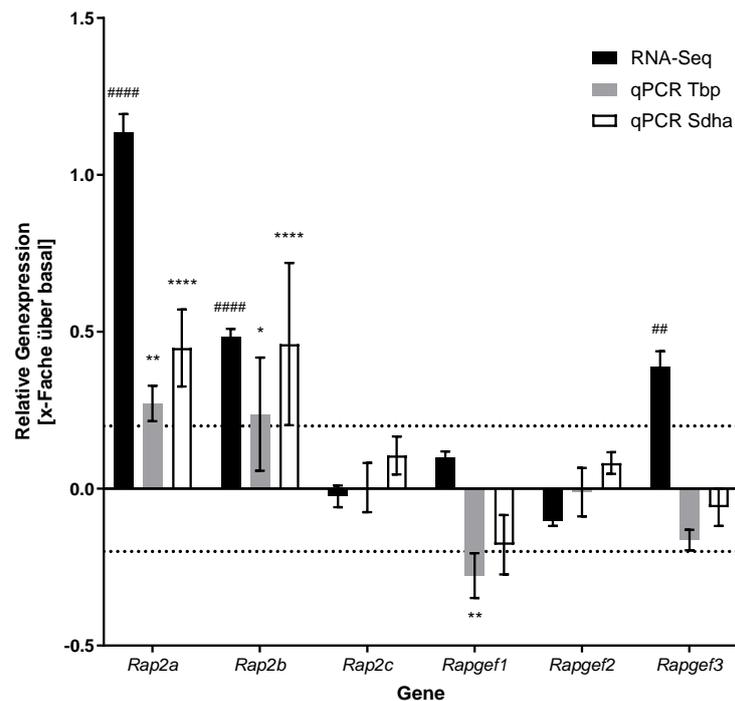


Abbildung 3.25: **Rap-Familie**

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Darstellung der relativen Expression ausgewählter Gene der RAP-Familie und deren Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF). In Schwarz die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Signifikante Unterschiede sind mit # markiert. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit Hilfe des Wald-Tests, False-Discovery-Rate korrigiert nach Benjamini und Hochberg,  $n = 3$ . In Grau die Ergebnisse der RT-qPCR normiert auf das Referenzgen *Tbp* und in Weiß auf das Referenzgen *Sdha*. Signifikante Unterschiede gemäß two-way ANOVA sind mit \* markiert,  $n = 3$ .

bei der Infiltration anderer Gewebe (Bros *et al.*, 2019; Pertz *et al.*, 2006). *Rhoa*<sup>82</sup> war in der RNA-Sequenzierung durch Glukose nicht signifikant um 6 % von 171,1 RPKM auf 182,0 RPKM in seiner Expression verändert worden. In der RT-qPCR dagegen zeigte sich unter Normierung auf *Tbp* eine Verstärkung um 20 % und unter Normierung auf *Sdha* um 28 %, welche sich allerdings als nicht signifikant herausstellten.

**Rhob** RHOB ist ebenfalls an der Regulation von Aktinfilamenten beteiligt und spielt außerdem eine Rolle beim endosomalen Vesikeltransport. Darüber hinaus vermittelt RHOB die Apoptose von Zellen nach DNA-Schädigung (Prendergast, 2001). In der RNA-Sequenzierung war für *Rhob*<sup>83</sup> noch eine leichte Reduktion der Expression durch Glukose um 18 % von 90 RPKM auf 74,2 RPKM zu beobachten gewesen. Zwar ließ sich auch in der RT-qPCR mit einer Verringerung der Expression um 15 % unter Normierung auf *Tbp* und um 12 % unter Normierung auf *Sdha* die Tendenz zu einer leichten Repression des Gens erkennen, nur war diese nicht signifikant.

**Rhoj** RHOJ spielt u.a. bei der endothelialen Beweglichkeit und der Angiogenese eine Rolle (Leszczynska *et al.*, 2011). Debaugnies *et al.* (2023) berichten außerdem, dass RHOJ neben seiner Funktion als Förderer der Tumorzellproliferation sowie der über Aktinfilamente vermittelten Tumorzellinvasion und -migration die Resistenz von Tumorzellen mit epithelialer-zu-mesenchymaler Transition (EMT) gegenüber Chemotherapeutika über Förderung von DNA-Reparaturmechanismen vermittelt. Sowohl in der RNA-Sequenzierung, in der sich für *Rhoj*<sup>84</sup> eine insignifikante Verminderung der Expression um 11 % von 6,8 RPKM auf 6,0 RPKM zeigte, als auch in der RT-qPCR, bei der eine ebenfalls insignifikante Reduktion um 18 % unter Normierung auf *Tbp* und um 12 % unter Normierung auf *Sdha* zu beobachten war, war für *Rhoj* kein wesentlicher Effekt der Glukose auf die Expression festzustellen.

**Rhou** RHOU, auch bekannt als *Wnt-1 Responsive Cdc42 Homolog 1* (WRCH1), wird u.a. durch den WNT-1-Signalweg in seiner Expression gesteigert und führt zur Ausbildung von Filopodien sowie zur Steigerung der Zellproliferation Tao *et al.* (2001). In Multiplen-Myelom-Zellen konnten Canovas Nunes *et al.* (2018) zeigen, dass RHOU außerdem durch IL-6 über den JAK/STAT-Signalweg (insbesondere STAT3) in seiner Expression hochreguliert wird und die Aktin-vermittelte Zellmigration fördert. Während für *Rhou*<sup>85</sup> in der RNA-Sequenzierung noch eine deutliche Induktion der Expression durch Glukose um 51 % von 7,0 RPKM auf 10,6 RPKM festgestellt werden konnte, so war dieser Effekt in der RT-qPCR nicht zu reproduzieren. Hier zeigte sich *Rhou* unter Normierung auf *Tbp* gar nicht und unter Normierung auf *Sdha* nicht signifikant um +6 % durch Glukose verändert.

<sup>82</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11848> aufgerufen am 04.03.2022.

<sup>83</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11852> aufgerufen am 04.03.2022.

<sup>84</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/80837> aufgerufen am 04.03.2022.

<sup>85</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/69581> aufgerufen am 04.03.2022.

**Arhgef2** Der *RhoA Guanine Nucleotide Exchange Factor 2* (ARHGEF2) wird durch die *Microtubule Affinity-regulating Kinase 3* (MARK3) phosphoryliert und dadurch aktiviert, was die Loslösung von ARHGEF2 von den Mikrotubuli zur Folge hat, sodass es RHOA aktivieren und die Ausbildung von Stressfasern und Fokalkontakten induzieren kann (Sandí *et al.*, 2017). In der RNA-Sequenzierung zeigte sich *Arhgef2*<sup>86</sup> durch Glukose in seiner Expression um 56 % von 38,1 RPKM auf 16,9 RPKM reduziert. Auch in der RT-qPCR-Analyse ließ sich eine, wenn auch etwas schwächere, Reduktion der Expression um 46 % bei Normierung auf *Tbp* und um 47 % bei Normierung auf *Sdha* beobachten.

**Arhgef4** ARHGEF4, auch bekannt als APC-Stimulated Guanine Nucleotide Exchange Factor (ASEF), wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert (Thiesen *et al.*, 2000). Er bindet RHOA und RAC und führt über eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts zur Ausbildung von Lamellipodien (Kawasaki *et al.*, 2000). Für *Arhgef4*<sup>87</sup> ließ sich in der RNA-Sequenzierung eine Reduktion der Expression um 63 % von 2,7 RPKM auf 1,0 RPKM beobachten. In der RT-qPCR-Analyse war nur die bei Normierung auf *Tbp* beobachtete Reduktion um 33 % signifikant, wohingegen die bei Normierung auf *Sdha* beobachtete Reduktion um 29 % nicht signifikant war.

**Arhgef19** ARHGEF19 aktiviert nicht nur RHOA, sondern auch über BRAF den MAPK-Signalweg und spielt dadurch eine Rolle bei verschiedenen Tumorarten, wie z.B. dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Li *et al.*, 2018). *Arhgef19*<sup>88</sup> war mit 114 % Induktion von 3,5 RPKM auf 7,4 RPKM in der RNA-Sequenzierung eines der am stärksten durch Glukose induzierten Gene gewesen. In der qPCR-Analyse dagegen war dies nicht der Fall. Hier ließ sich unter Normierung auf *Tbp* eine insignifikante Steigerung der Expression um 6 % und unter Normierung auf *Sdha* von 14 % nachweisen.

**Arhgef39** ARHGEF39 aktiviert RAC1 und fördert dadurch die Tumormigration und -invasion. Entsprechend präsentiert sich ARHGEF39 auch in bestimmten Lungentumoren als hochreguliert. (Cooke *et al.*, 2021). *Arhgef39*<sup>89</sup> war in der RNA-Sequenzierung durch Glukose um 127 % von 1,4 RPKM auf 3,2 RPKM in seiner Expression induziert worden. In der RT-qPCR allerdings ließ sich kein wesentlicher Einfluss von Glukose auf die Expression des Gens feststellen. Unter Normierung auf *Tbp* ergab sich eine leichte, insignifikante Verminderung um 5 %, wohingegen sich unter Normierung auf *Sdha* eine leichte, ebenfalls insignifikante Steigerung um 2 % erkennen ließ.

**Dlc1** Nach Untersuchung von vier RHO-GTPasen und vier RHO-Guaninnukleotid-Austauschfaktoren im Hinblick auf ihr Expressionsverhalten unter Glukose, wurde mit *Dlc1* auch noch das Gen eines RHO-GTPase-aktivierenden Proteins untersucht. DLC1 (*Deleted*

<sup>86</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16800> aufgerufen am 04.03.2022.

<sup>87</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/226970> aufgerufen am 04.03.2022.

<sup>88</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/213649> aufgerufen am 04.03.2022.

<sup>89</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/230098> aufgerufen am 04.03.2022.

In *Liver Cancer 1 Protein*), auch bekannt als ARHGAP7 (*Rho-GTPase-Activating Protein 7*) ist ein Tumorsuppressorgen, welches den RHOA/ROCK/MLC2 (Myosin Light Chain 2)-Signalweg inhibiert und dessen Deletion zur Ausbildung von Leberkarzinomen führt (Xue *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2008). In der RNA-Sequenzierung hatte sich für das Gen *Dlc1*<sup>90</sup> eine Reduktion seiner Expression durch Glukose um 36 % von 4,2 RPKM auf 2,7 RPKM ergeben. Auch in der RT-qPCR war eine Reduktion zu beobachten. Unter Normierung auf *Tbp* zeigte sich eine Reduktion um 27 % und unter Normierung auf *Sdha* um 26 %, wobei letztere nicht signifikant war.

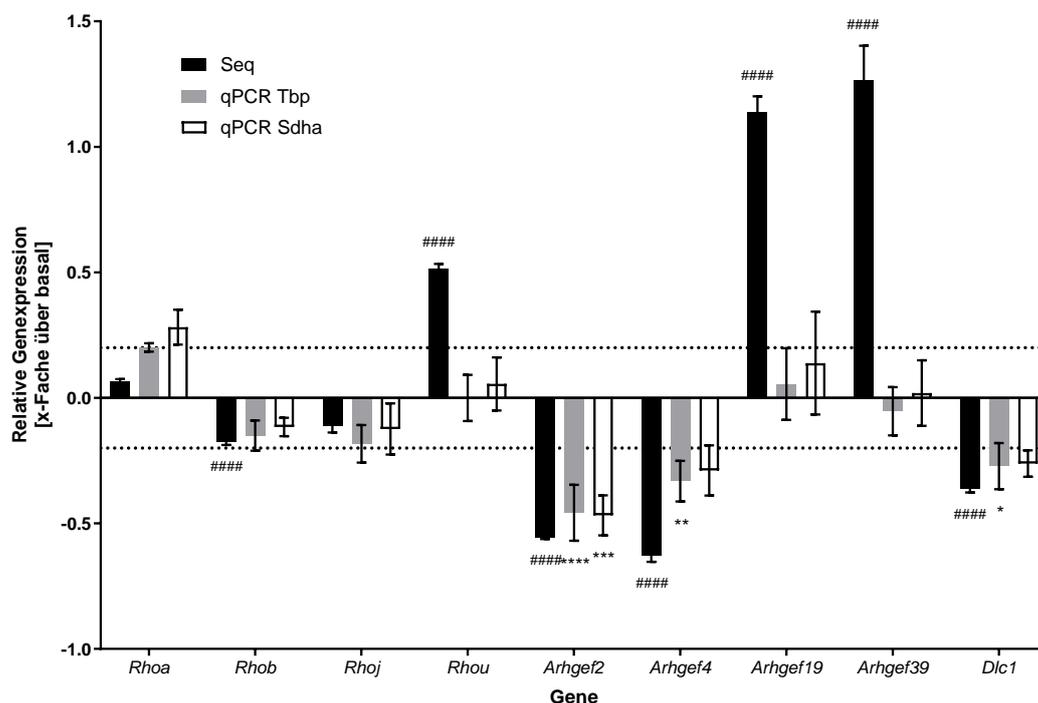


Abbildung 3.26: **Rho-Familie**

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Darstellung der relativen Expression ausgewählter Gene der RHO-Familie, deren Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF) und eines ihrer GTPase-aktivierenden Proteine (GAP). In Schwarz die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Signifikante Unterschiede sind mit # markiert. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit Hilfe des Wald-Tests, False-Discovery-Rate korrigiert nach Benjamini und Hochberg,  $n = 3$ . In Grau die Ergebnisse der RT-qPCR normiert auf das Referenzgen *Tbp* und in Weiß auf das Referenzgen *Sdha*. Signifikante Unterschiede gemäß two-way ANOVA sind mit \* markiert,  $n = 3$ .

<sup>90</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/50768> aufgerufen am 04.03.2022.

### 3.3.16 Heterotrimere G-Proteine

**Übersicht** Heterotrimere G-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), welche ein breites Spektrum von Stoffen wie Hormonen, Neurotransmittern, Geruchs- und Geschmacksstoffen sowie Metaboliten binden. Sie werden in vier Gruppen unterteilt:  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  und  $G_{12}$ . Von den letztgenannten drei Gruppen wurden in der vorliegenden Arbeit jeweils ausgewählte Vertreter in ihrer Genexpression in Abhängigkeit der Medium-Glukosekonzentration untersucht (Abbildung 3.27).

**Gna11** Das *Guanine Nucleotide Binding Protein, Alpha 11* (GNA11) wird zu den  $\alpha$ -Untereinheiten der  $G_q$ -Proteine gezählt, zu denen außerdem noch GNAQ, GNA14 und GNA15 gehören. Sie aktivieren die Phospholipase  $C\beta$  welche Phosphatidylinositoldiphosphat ( $PIP_2$ ) zu Phosphatidylinositoltriphosphat ( $PIP_3$ ) und Diacylglycerin (DAG) hydrolysiert. Diese wirken wiederum als *Second Messenger*, wobei  $PIP_3$  die intrazelluläre Freisetzung der Kalziumspeicher und DAG die Aktivierung der Proteinkinase C bewirken (Netzker & Deutzmann, 2022b). Mutierte Formen von GNA11 sind in Melanomen der Uvea zu finden (Raamsdonk *et al.*, 2010). GNA11 ist außerdem in die Regulation der Kalziumhomöostase involviert und Loss-of-Function-Mutationen von GNA11 führen zur familiären hypokalziurischen Hyperkalzämie Typ 2 (Gorvin *et al.*, 2016). Mit Hilfe der RNA-Sequenzierung konnte eine Induktion der Expression durch Glukose von *Gna11*<sup>91</sup> um 39 % von 31,5 RPKM auf 44,0 RPKM festgestellt werden. In abgeschwächter Form war dieser Effekt auch in der RT-qPCR nachweisbar und betrug unter Normierung auf *Tbp* 15 % und unter Normierung auf *Sdha* 29 %.

**Gna12** GNA12 ist der Namensgeber für die vierte Gruppe der heterotrimeren G-Proteine, zu welcher noch GNA13 gehört (Strathmann & Simon, 1991). GNA12 und GNA13 vermitteln die Signale von diversen Rezeptoren und sind in ein breites Spektrum von Erkrankungen involviert, welche von unterschiedlichsten Krebsformen bis zur Lungenfibrose reichen (Guo *et al.*, 2022). GNA12 aktiviert u.a. über das RHO-GEF ARHGEF12 RHOA, was wiederum über die Aktivierung von ROCK zur SRF-abhängigen Gentranskription und über eine Beeinflussung des Zytoskeletts zur Veränderung der Zellform führt (Siehler, 2009). *Gna12*<sup>92</sup> war sowohl in der RNA-Sequenzierung mit einer Erhöhung der RPKM-Werte um 4 % von 29,6 RPKM auf 30,8 RPKM, als auch in der RT-qPCR mit einer um 6 % insignifikant verminderten Expression unter Normierung auf *Tbp* und um 2 % insignifikant gesteigerten Expression nicht wesentlich durch Glukose beeinflusst worden.

**Gna13** GNA13 ist der zweite Vertreter der  $G_{12}$ -Gruppe, welcher ebenfalls den RHO-Signalweg aktivieren kann, wobei unklar ist, wie die Selektivität der Rezeptoren für GNA12 oder GNA13 zustande kommt (Guo *et al.*, 2022). Die Expression von *Gna13*<sup>93</sup> war in der

<sup>91</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14672> aufgerufen am 03.03.2022.

<sup>92</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14673> aufgerufen am 03.03.2022.

<sup>93</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14674> aufgerufen am 03.03.2022.

RNA-Sequenzierung durch Glukose um 23 % von 20,8 RPKM auf 15,9 RPKM reduziert worden. Dieser Effekt ließ sich im Rahmen der RT-qPCR nicht nachweisen. Hier zeigte sich unter Normierung auf *Tbp* eine insignifikante Reduktion der Expression um 9 % und unter Normierung auf *Sdha* gar keine Veränderung der Expression.

**Gnai1** Die Gruppe der inhibitorischen  $\alpha$ -Untereinheiten von heterotrimären G-Proteinen ( $G_{\alpha i}$ ) wirken hemmend auf die Adenylatzyklase und verhindern dadurch einen Anstieg der cAMP-Konzentration. Hermouet *et al.* (1993) konnten die GNAI1-vermittelte Inhibition der Adenylatzyklase am Beispiel der Forskolin-induzierten cAMP-Akkumulation nachweisen. Während in der RNA-Sequenzierung für das *Guanine Nucleotide Binding Protein, Alpha Inhibiting 1* (*Gnai1*)<sup>94</sup> noch eine Verstärkung der Expression um 24 % von 6,3 RPKM auf 7,7 RPKM zu beobachten war, zeigte sich das Gen in der RT-qPCR durch Glukose nicht wesentlich beeinflusst. Unter Normierung auf *Tbp* kam es lediglich zu einer insignifikanten Reduktion der Expression um 12 % und unter Normierung auf *Sdha* um 3 %.

**Gnai2** Im Rahmen der RNA-Sequenzierung ließ sich für das Gen *Gnai2*<sup>95</sup> eine Induktion der Expression durch Glukose um 37 % von 128,7 RPKM auf 175,6 RPKM feststellen. Ein ähnlich ausgeprägter Effekt ließ sich auch in der RT-qPCR nachweisen, wo eine Induktion um 24 % unter Normierung auf *Tbp* und um 39 % unter Normierung auf *Sdha* zu beobachten war.

**Gnai3** *Gnai3*<sup>96</sup> war in der RNA-Sequenzierung nicht signifikant um 15 % von 53,5 RPKM auf 61,5 RPKM durch Glukose in seiner Expression positiv beeinflusst worden. In der RT-qPCR ließ sich dagegen eine signifikante Induktion der Expression um 30 % unter Normierung auf *Sdha* beobachten. Die Steigerung der Expression um 17 % unter Normierung auf *Tbp* war dagegen nicht signifikant.

**Gnao1** Das *Guanine Nucleotide Binding Protein, Alpha O* (GNAO1) ist besonders im Gehirn exprimiert und vermittelt über Bindung von entsprechenden GPCRs die Wirkung verschiedenster Neurotransmitter, wie z.B. GABA oder Adrenalin, indem es die Adenylatzyklase, Kalziumkanäle und die Freisetzung von Neurotransmittern aus Vesikeln inhibiert. *Loss-of-Function*-Mutationen von GNAO1 führen zu Epilepsien und *Gain-of-Function*-Mutationen von GNAO1 führen zu Bewegungsstörungen (Feng *et al.*, 2018). *Gnao1*<sup>97</sup> war in der RNA-Sequenzierung um 100% von 1,9 RPKM auf 3,9 RPKM in seiner Expression durch Glukose induziert worden. Dagegen war in der RT-qPCR kein wesentlicher Effekt mehr zu beobachten. Unter Normierung auf *Tbp* ergab sich eine insignifikante Steigerung um 8 % und unter Normierung auf *Sdha* um 22 %.

<sup>94</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14677> aufgerufen am 03.03.2022.

<sup>95</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14678> aufgerufen am 03.03.2022.

<sup>96</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14679> aufgerufen am 03.03.2022.

<sup>97</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14681> aufgerufen am 03.03.2022.

**Gnaq** Das *Guanine Nucleotide Binding Protein, Alpha Q Polypeptide* ist der Namensgeber der Subgruppe der  $G_{\alpha q}$ -Proteine, von denen GNA11 als weiterer Vertreter bereits oben besprochen wurde. Wie bei GNA11 führen Mutationen von GNAQ ebenfalls zu Melanomen der Uvea (Van Raamsdonk *et al.*, 2009). In der RNA-Sequenzierung zeigte sich für *Gnaq*<sup>98</sup> eine insignifikante Steigerung der Expression um 9 % von 16,2 RPKM auf 17,6 RPKM. Auch in der RT-qPCR ergab sich keine wesentliche Beeinflussung von *Gnaq* durch Glukose. Unter Normierung auf *Tbp* zeigte es sich gar nicht verändert und unter Normierung auf *Sdha* war eine statistisch insignifikante Steigerung um 10 % zu beobachten.

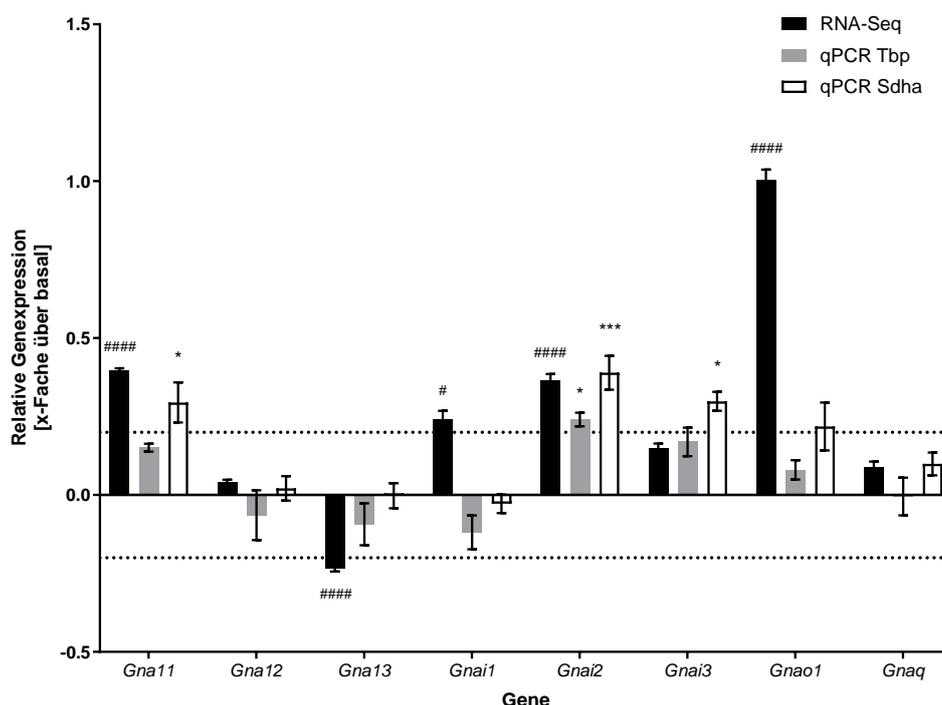


Abbildung 3.27:  $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Darstellung der relativen Expression ausgewählter Gene der  $\alpha$ -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine. In Schwarz die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Signifikante Unterschiede sind mit # markiert. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit Hilfe des Wald-Tests, False-Discovery-Rate korrigiert nach Benjamini und Hochberg,  $n = 3$ . In Grau die Ergebnisse der RT-qPCR normiert auf das Referenzgen *Tbp* und in Weiß auf das Referenzgen *Sdha*. Signifikante Unterschiede gemäß two-way ANOVA sind mit \* markiert,  $n = 3$ .

<sup>98</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14682> aufgerufen am 03.03.2022.

### 3.3.17 Adenylatzyklen

**Übersicht** Die transmembranären, plasmamembranständigen Adenylatzyklen synthetisieren cAMP, einen wichtigen *Second Messenger*, welcher diverse Signale innerhalb der Zelle vermittelt und u.a. auch die Proteinkinase A aktiviert, welche das bereits weiter oben besprochene CREB phosphoryliert und damit aktiviert. Die  $G_{\alpha_s}$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine stimulieren, die  $G_{\alpha_i}$ -Untereinheiten inhibieren die cAMP-Synthese durch die Adenylatzyklen. Forskolin, welches in der vorliegenden Arbeit ebenfalls zum Einsatz kam, ist ein direkter, G-Protein unabhängiger Aktivator der Adenylatzyklen (Netzker & Deutzmann, 2022a).

**Adcy1** Kitaguchi *et al.* (2013) beschrieben für eine pankreatische Zelllinie eine Steigerung der Insulinsekretion durch eine Kalium-induzierte Aktivierung der *Adenylate Cyclase 1* (ADCY1). Sowohl in der RNA-Sequenzierung als auch in der RT-qPCR war die *Adcy1*<sup>99</sup> in ihrer Expression durch Glukose signifikant reduziert worden. Der Effekt war in der RT-qPCR mit Mittelwerten von 32 % unter Normierung auf *Tbp* und 31 % unter Normierung auf *Sdha* etwas stärker als in der RNA-Sequenzierung, wo sich eine Repression durch Glukose um 20 % von 2,2 RPKM auf 1,8 RPKM gezeigt hatte (Abbildung 3.28).

**Adcy3** Für den MC4R, dessen Mutationen, wie eingangs erwähnt, die häufigste Ursache für monogenetische Adipositas darstellen, ist die Kolo-kalisierung mit ADCY3 beschrieben (Siljee *et al.* , 2018). Jedoch auch Mutationen der ADCY3 selbst sind mit einem erhöhten Risiko für Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 verbunden (Grarup *et al.* , 2018). Die *Adcy3*<sup>100</sup> war weder in der RNA-Sequenzierung noch in der RT-qPCR wesentlich durch Glukose in seiner Expression beeinflusst. In der RNA-Sequenzierung hatte sich eine insignifikante Steigerung um 14 % von 1,0 RPKM auf 1,1 RPKM gezeigt. In der RT-qPCR war unter Normierung auf *Tbp* eine Steigerung um 10 % und unter Normierung auf *Sdha* um 16 % zu beobachten, die beide ebenfalls statistisch nicht signifikant waren.

**Adcy6** Die ADCY6 vermittelt u.a. die durch  $\beta$ -Adrenozeptoren vermittelte Vasodilatation (Gros *et al.* , 2007). Sowohl in der RNA-Sequenzierung als auch in der RT-qPCR war die *Adcy6*<sup>101</sup> durch Glukose signifikant induziert worden. Der Effekt war mit einer Steigerung um 63 % von 11,5 RPKM auf 18,8 RPKM in der RNA-Sequenzierung deutlich stärker als in der RT-qPCR, im Rahmen derer mittlere Induktionen von 28 % unter Normierung auf *Tbp* und 37 % unter Normierung auf *Sdha* ermittelt wurden.

### 3.3.18 Glukosetransporter

**Übersicht** Von den insgesamt 13 Glukosetransportern wurden in der vorliegenden Arbeit zwei untersucht (Abbildung 3.29), nämlich der Glukosetransporter 1, auch als GLUT1

<sup>99</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/432530> aufgerufen am 04.03.2022.

<sup>100</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/104111> aufgerufen am 04.03.2022.

<sup>101</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11512> aufgerufen am 04.03.2022.

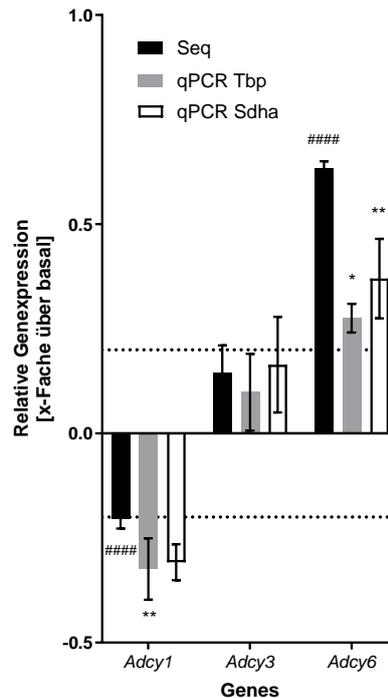


Abbildung 3.28: **Adenylatzyklen**

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Darstellung der relativen Expression der Adenylatzyklen 1, 3 und 6 (*Adcy1*, *Adcy3*, *Adcy6*). In Schwarz die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Signifikante Unterschiede sind mit # markiert. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit Hilfe des Wald-Tests, False-Discovery-Rate korrigiert nach Benjamini und Hochberg,  $n = 3$ . In Grau die Ergebnisse der RT-qPCR normiert auf das Referenzgen *Tbp* und in Weiß auf das Referenzgen *Sdha*. Signifikante Unterschiede gemäß two-way ANOVA sind mit \* markiert,  $n = 3$ .

oder SLC2A1 (*Solute Carrier Family 2 Member 1*) bekannt, und der Glukosetransporter 6 (GLUT6 oder SLC2A6).

**Slc2a1** GLUT1 oder SLC2A1 ist ein annähernd ubiquitär vorkommender Glukosetransporter, der neben anderen Glukosetransportern auch in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas exprimiert wird. Er besitzt eine besonders hohe Affinität für Glukose und ist für die insulinunabhängige, kontinuierliche Glukoseaufnahme in die Zelle verantwortlich und stellt damit die Energieversorgung insbesondere der glukoseabhängigen Zellen, wie Neuronen des zentralen Nervensystems oder Erythrozyten, sicher (Hauser, 2022). *Slc2a1*<sup>102</sup> zeigte sich sowohl in der RNA-Sequenzierung als auch in der RT-qPCR durch Glukose in seiner Expression reduziert. In der RNA-Sequenzierung betrug der Effekt mit einer Reduktion von 21,4 RPKM auf 14,3 RPKM 33 %. In der RT-qPCR-Analyse war der Effekt etwas geringer. Unter Normierung auf *Tbp* zeigte sich eine Reduktion von 29 % und unter Normierung auf *Sdha* von 26 %.

**Slc2a6** GLUT6 oder SLC2A6 ist insbesondere in den lysosomalen Membranen von Makrophagen exprimiert und transportiert selbst keine Glukose. Ihm wird eine Rolle bei der Modulation der Glykolyse in Makrophagen zugesprochen (Maedera *et al.*, 2019). GLUT6 scheint außerdem eine Rolle bei Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 zu spielen. So beobachteten Chen *et al.* (2022) eine positive Korrelation zwischen der SLC2A6-Expression und dem Body Mass Index von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2. In der RNA-Sequenzierung hatte sich *Slc2a6*<sup>103</sup> eine deutliche Reduktion der Expression durch Glukose um 39 % von 10,8 RPKM auf 6,5 RPKM ergeben. Auch in der RT-qPCR-Analyse ließ sich die Tendenz einer Reduktion der Expression erkennen (*Tbp*: -31 %; *Sdha*: -24 %), allerdings war der Fehlerbereich so groß, dass dieser Effekt nicht wesentlich signifikant war.

### 3.3.19 Sirtuine

**Übersicht** Sirtuine deazetylieren Nikotinamidadenindinukleotid-abhängig Lysin-Reste diverser Proteine und scheinen über ihre Beteiligung an unterschiedlichen zellulären Prozessen, wie etwa dem Zellzyklus, der Apoptose, dem Stoffwechsel und der Signaltransduktion einen positiven Einfluss auf die Langlebigkeit von Zellen zu haben (Verdin *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2014). Alle sieben Mitglieder dieser Proteinfamilie (*Sirt1-7*) wurden in der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf deren Genexpression in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration im Kulturmedium hin untersucht (Abbildung 3.30).

**Sirt1** Morselli *et al.* (2010) stellten fest, dass SIRT1, welches zur ersten Klasse der Sirtuine gehört, eine wichtige Rolle bei der durch Kalorienrestriktion vermittelten Autophagie spielt, einem Prozess der von besonderer Bedeutung für die Langlebigkeit von Zellen ist. Außerdem vermittelt SIRT1 bei Kalorienrestriktion die Transkription von Genen der

<sup>102</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20525> aufgerufen am 04.03.2022.

<sup>103</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/227659> aufgerufen am 04.03.2022.

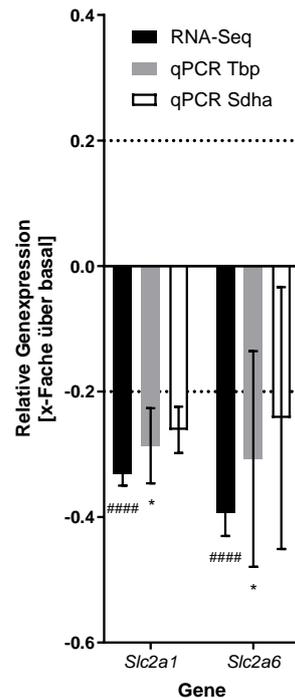


Abbildung 3.29: **Glukosetransporter**

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Darstellung der relativen Expression der Glukosetransporter 1 und 6 (*Glut1/Slc2a1*, *Glut6/Slc2a6*). In Schwarz die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Signifikante Unterschiede sind mit # markiert. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit Hilfe des Wald-Tests, False-Discovery-Rate korrigiert nach Benjamini und Hochberg,  $n = 3$ . In Grau die Ergebnisse der RT-qPCR normiert auf das Referenzgen *Tbp* und in Weiß auf das Referenzgen *Sdha*. Signifikante Unterschiede gemäß two-way ANOVA sind mit \* markiert,  $n = 3$ .

Glukoneogenese (Rodgers *et al.* , 2005). Darüber hinaus vermittelt SIRT1 die Stressreaktion der Zelle bei Hypoxie u.a. durch die Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren (Dioum *et al.* , 2009).

*Sirt1*<sup>104</sup> war im Rahmen der RNA-Sequenzierung in seiner Expression durch Glukose um 51 % von 30,4 RPKM auf 15 RPKM reduziert worden. Auch in der RT-qPCR zeigte sich eine Reduktion der Expression. Allerdings war diese etwas weniger stark und bewegte sich unter Normierung auf *Tbp* bei 28 % und unter Normierung auf *Sdha* bei 20 %. Hierbei war nur die Repression unter Normierung auf *Tbp* signifikant.

**Sirt2** Diverse neurodegenerative Erkrankungen werden durch die intrazelluläre Anhäufung (fehlgefalteter) Proteine verursacht. Outeiro *et al.* (2007) beobachteten, dass die Hemmung von SIRT2, welches ebenfalls zur ersten Klasse der Sirtuine gehört, der schädlichen Anhäufung von  $\alpha$ -Synuklein beim Morbus Parkinson entgegenwirkt. Ergänzend hierzu werden SIRT2 auch vielfältige Rollen im Metabolismus zugeschrieben, wie bei der Erhöhung der Insulinsensitivität, der Verringerung von Sauerstoffradikalen oder der Hemmung von entzündlichen Prozessen (Gomes *et al.* , 2015).

*Sirt2*<sup>105</sup> zeigte sowohl in der RNA-Sequenzierung als auch in der RT-qPCR keine Beeinflussung durch Glukose. Die in der RNA-Sequenzierung zu beobachtende Tendenz einer Reduktion um 5 % von 33,2 RPKM auf 31,4 RPKM war ebenso insignifikant wie die mit Hilfe der RT-qPCR festgestellte Reduktion unter Normierung auf *Tbp* um 7 % oder die unter Normierung auf *Sdha* festgestellte Steigerung der Expression um 5 %.

**Sirt3** SIRT3, welches das dritte Mitglied der ersten Klasse der Sirtuine bildet, kommt vornehmlich in den Mitochondrien vor und spielt hier eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des zellulären Energieniveaus unter oxidativem Stress, was Cheung *et al.* (2015) unter anderem durch die protektive Wirkung von SIRT3 auf Kardiomyozyten, die Doxorubicin ausgesetzt worden waren, zeigen konnten. Zhu *et al.* (2014) schreiben SIRT3 außerdem die Rolle eines Tumorsuppressors zu.

*Sirt3*<sup>106</sup> war ebenfalls in der RNA-Sequenzierung durch Glukose in seiner Expression reduziert worden, und zwar um etwas mehr als 43 % von 3,3 RPKM auf 1,9 RPKM. Eine Repression durch Glukose war auch in der RT-qPCR zu beobachten. Dieser Effekt war mit - 27 % allerdings nur unter Normierung auf *Tbp* signifikant. Die unter Normierung auf *Sdha* beobachtete Reduktion um 18 % hingegen war es nicht.

**Sirt4** Laurent *et al.* (2013) konnten nachweisen, dass das ebenfalls in den Mitochondrien lokalisierte SIRT4, welches eine eigene Klasse unter den Sirtuinen bildet, die Oxidation von Fettsäuren hemmt und die Lipogenese fördert. Wie auch schon SIRT3 wird auch SIRT4 als Tumorsuppressor angesehen (Zhu *et al.* , 2014).

<sup>104</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/93759> aufgerufen am 25.02.2022.

<sup>105</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/64383> aufgerufen am 25.02.2022.

<sup>106</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/64384> aufgerufen am 25.02.2022.

*Sirt4*<sup>107</sup> war weder in der RNA-Sequenzierung noch in der RT-qPCR signifikant in seiner Expression durch Glukose beeinflusst worden. In der RNA-Sequenzierung hatte sich eine insignifikante Steigerung der Expression um 13 % von 2,0 RPKM auf 2,2 RPKM beobachten lassen. Mit Hilfe der RT-qPCR war unter Normierung auf *Tbp* eine minimale Reduktion von weniger als 1 % festgestellt worden. Unter Normierung auf *Sdha* hingegen zeigte sich eine abermals nicht signifikante Steigerung der Expression um 13 %.

**Sirt5** SIRT5 bildet die dritte Klasse der Sirtuine. Das in Mitochondrien und Peroxisomen vorkommende Protein deazetyliert diverse Enzyme der Fettsäureoxidation. Chiba *et al.* (2019) konnten bei SIRT5-Knockout-Mäusen eine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen verbesserte Nierenfunktion nach Ischämie- oder Cisplatin-induziertem Nierenversagen beobachten. Während in diesem Fall die Inhibition von SIRT5 zu einer verbesserten Organfunktion nach Stress führte, beobachteten Hershberger *et al.* (2017) ein verschlechtertes Überleben von SIRT5-Knockout-Mäusen mit hochdruck-induzierter Herzhypertrophie. SIRT5 wirkte hier also protektiv. SIRT5 wird eine ebenfalls protektive Rolle auf die Mitochondrien zugeschrieben, da es die Fragmentierung und Autophagie dieser Zellorganellen bei Nährstoffmangel verhindert (Guedouari *et al.*, 2017).

*Sirt5*<sup>108</sup> war weder in der RNA-Sequenzierung noch in der RT-qPCR signifikant durch Glukose in seiner Expression beeinflusst worden. In der RNA-Sequenzierung hatte sich eine minimale und insignifikante Steigerung der Expression um 3 % von 1,7 RPKM auf 1,8 RPKM ergeben. Unter Normierung auf *Tbp* war mit Hilfe der RT-qPCR eine insignifikante Verminderung der Expression um 7 % und unter Normierung auf *Sdha* eine ebenfalls insignifikante Steigerung der Expression um 5 % festgestellt worden.

**Sirt6** SIRT6 gehört zur vierten und letzten Klasse der Sirtuine und ist vornehmlich im Zellkern anzutreffen. SIRT6 wird wie andere Vertreter der Sirtuine ebenfalls mit der Förderung der Langlebigkeit von Zellen und Organismus in Verbindung gebracht. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass SIRT6 an der Regulation und Aufrechterhaltung der Telomere beteiligt ist (Michishita *et al.*, 2008). Darüber hinaus spielt SIRT6 noch eine wichtige Rolle bei der Glukosehomöostase. So zeigten Zhong *et al.* (2010), dass eine SIRT6-Defizienz über eine gesteigerte Glukoseaufnahme und Glukolyse sowie die Hemmung der Atmungskette zu einer Hypoglykämie und einem frühen Tod von Versuchstieren führte.

*Sirt6*<sup>109</sup> war in der RNA-Sequenzierung durch Glukose in seiner Expression um 29 % von 7,9 RPKM auf 5,6 RPKM reduziert worden. Dieser Effekt ließ sich in der RT-qPCR nur bei Normierung auf das Referenzgen *Tbp* in leicht abgeschwächter Form mit einer Reduktion um 24 % reproduzieren. Die unter Normierung auf *Sdha* beobachtete Reduktion von 15 % war hingegen nicht signifikant.

<sup>107</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/75387> aufgerufen am 25.02.2022.

<sup>108</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/68346> aufgerufen am 25.02.2022.

<sup>109</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/50721> aufgerufen am 25.02.2022.

**Sirt7** SIRT7 bildet das zweite Mitglied der vierten Klasse der Sirtuine und ist ebenfalls im Nukleus angesiedelt. Ihm kommt eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur und damit bei der Aufrechterhaltung der Integrität des Genoms zu (Vazquez *et al.*, 2016). Auch SIRT7 ist in die zellulären Reaktionen auf Stress involviert und damit wichtig für die Stressresistenz der Zelle und des Organismus. So zeigten Vakhrusheva *et al.* (2008), dass SIRT7 die Stress-induzierte Apoptose von Herzzellen und die Ausbildung entzündlicher Kardiomyopathien verhindert.

*Sirt7*<sup>110</sup> war in der RNA-Sequenzierung durch Glukose nicht wesentlich beeinflusst worden. Es hatte sich lediglich die Tendenz einer Induktion um 14 % von 6,9 RPKM auf 7,8 RPKM erkennen lassen. In der RT-qPCR war ebenfalls keine eindeutige Veränderung erkennbar. Unter Normierung auf *Tbp* zeigte sich eine insignifikante Reduktion um 13 % und unter Normierung auf *Sdha* nur eine minimale Veränderung um -2 % beobachten ließ.

### 3.3.20 LEPROT und LEPROTL1

**Übersicht** Das *Leptin Receptor Overlapping Transcript* ist ein Protein mit vier Transmembrandomänen, welches das Vorkommen von Membranproteinen auf der Zelloberfläche durch die Förderung des Abbaus dieser Proteine über späte Endosomen und die Lysosomen herabsetzt. Ein Protein, dessen Expression auf der Zelloberfläche durch LEPROT herabgesetzt wird, ist der Leptin-Rezeptor. Durch Inhibition von LEPROT konnten Couturier *et al.* (2007) im Mausmodell die Signaltransduktion von Leptin erhöhen und die Ausbildung von Nahrungsaufnahme-bedingter Adipositas verhindern. Ein verwandtes Gen von LEPROT ist das *Leptin Receptor Overlapping Transcript-Like 1* (LEPROTL1). Zusätzlich zum Einfluss von LEPROT auf die Leptin-Signalübertragung wurde für LEPROT und LEPROTL1 ein Einfluss auf die Signalübertragung des *Growth Hormone* (GH) beschrieben. LEPROT und LEPROTL1 verringern die Anzahl auf der Zelloberfläche exprimierten GH-Rezeptoren und führen so zu Wachstumseinschränkungen, wobei sie selbst wiederum bei Nahrungsmangel oder Diabetes induziert und durch Insulin reprimiert werden (Touvier *et al.*, 2009). Angesichts dieser Bedeutung für den Stoffwechsel wurde der Einfluss von Glukose auf die Gene dieser beiden Proteine im folgenden näher untersucht (Abbildung 3.31).

**Leprot** *Leprot*<sup>111</sup> war in der RNA-Sequenzierung um 53 % von 19,9 RPKM auf 30,5 RPKM in seiner Expression verstärkt worden. Aufgrund einer größeren Fehlerstreuung war in der RT-qPCR keine eindeutige Aussage über sein Expressionsverhalten möglich. Unter Normierung auf *Tbp* war eine leichte und insignifikante Steigerung der Expression um 19 % zu beobachten, während sich unter Normierung auf *Sdha* eine Induktion um 35 % zeigte.

<sup>110</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/209011> aufgerufen am 25.02.2022.

<sup>111</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/230514> aufgerufen am 25.02.2022.

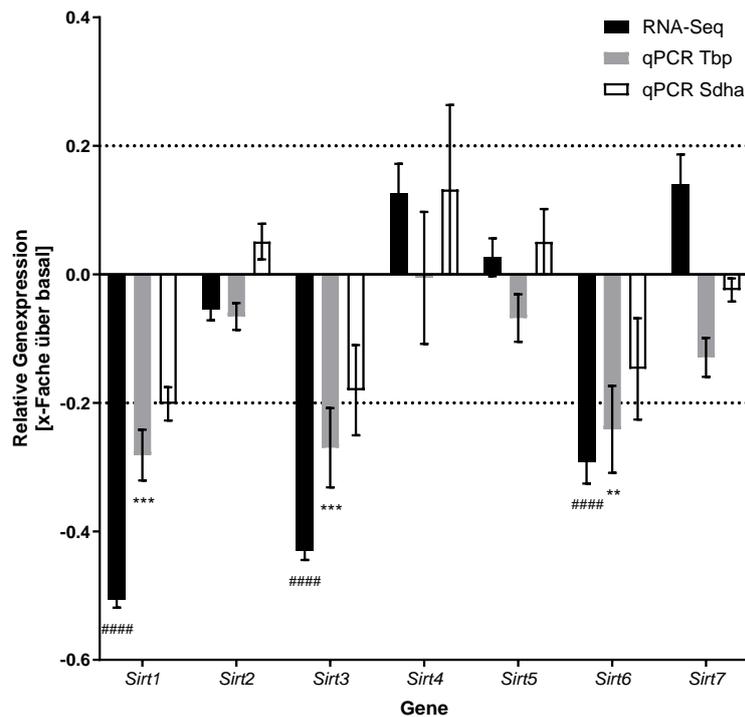


Abbildung 3.30: **Sirtuine**

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Darstellung der relativen Genexpression der Sirtuine (*Sirt1-7*). In Schwarz die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Signifikante Unterschiede sind mit # markiert. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit Hilfe des Wald-Tests, False-Discovery-Rate korrigiert nach Benjamini und Hochberg,  $n = 3$ . In Grau die Ergebnisse der RT-qPCR normiert auf das Referenzgen *Tbp* und in Weiß auf das Referenzgen *Sdha*. Signifikante Unterschiede gemäß two-way ANOVA sind mit \* markiert,  $n = 3$ .

***Leprot1*** *Leprot1*<sup>112</sup> war in der RNA-Sequenzierung durch Glukose in seiner Expression um 44 % von 45,9 RPKM auf 25,8 RPKM reduziert worden. Auch in der RT-qPCR zeigte sich eine Reduktion der Expression. Diese betrug unter Normierung auf *Tbp* 29 % und unter Normierung auf *Sdha* 20 %, wobei sie nur unter Normierung auf *Tbp* signifikant war.

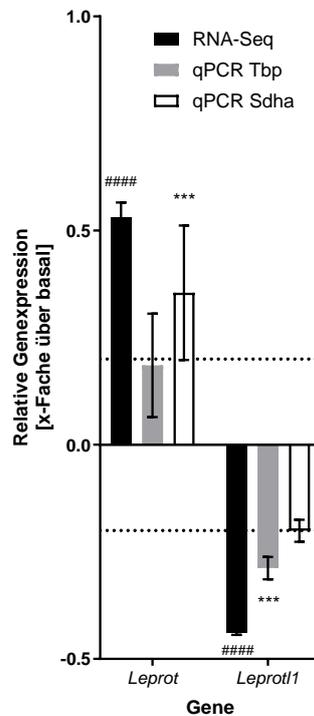


Abbildung 3.31: ***Leprot*** und ***Leprot1***

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Darstellung der relativen Genexpression von *Leprot* und *Leprot1*. In Schwarz die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Signifikante Unterschiede sind mit # markiert. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit Hilfe des Wald-Tests, False-Discovery-Rate korrigiert nach Benjamini und Hochberg,  $n = 3$ . In Grau die Ergebnisse der RT-qPCR normiert auf das Referenzgen *Tbp* und in Weiß auf das Referenzgen *Sdha*. Signifikante Unterschiede gemäß two-way ANOVA sind mit \* markiert,  $n = 3$ .

### 3.3.21 S100A10

***S100a10*** Das *S100 calcium binding protein A10 (calpactin)* stellt ein Kalzium-insensitives Mitglied der ansonsten durch Kalzium aktivierten S100-Proteinfamilie dar. S100A10 bildet Komplexe mit Annexin A2, einem membranbindenden Protein, und spielt hierüber

<sup>112</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/68192> aufgerufen am 25.02.2022.

eine wichtige Rolle beim Transport von Proteinen zur Plasmamembran, sodass diese an der Zelloberfläche exprimiert werden können (Rescher & Gerke, 2008).

*S100a10*<sup>113</sup> (Abbildung 3.32) zeigte in der RNA-Sequenzierung eine deutliche Induktion seiner Expression durch Glukose um 56 % von 226,8 RPKM auf 354,5 RPKM. Auch in der RT-qPCR konnte eine Induktion dieser Größenordnung beobachtet werden. Diese betrug unter Normierung auf *Tbp* 51 % und unter Normierung auf *Sdha* 72 %.

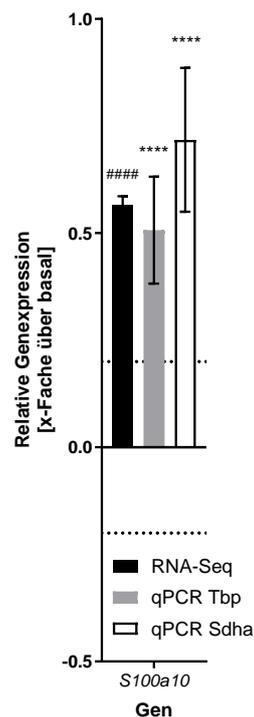


Abbildung 3.32: *S100a10*

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Darstellung der relativen Genexpression von *S100a10*. In Schwarz die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung. Signifikante Unterschiede sind mit # markiert. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit Hilfe des Wald-Tests, False-Discovery-Rate korrigiert nach Benjamini und Hochberg,  $n = 3$ . In Grau die Ergebnisse der RT-qPCR normiert auf das Referenzgen *Tbp* und in Weiß auf das Referenzgen *Sdha*. Signifikante Unterschiede gemäß two-way ANOVA sind mit \* markiert,  $n = 3$ .

<sup>113</sup><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20194> aufgerufen am 25.02.2022.

### 3.3.22 Gene, deren Expression durch Glukose hochsignifikant beeinflusst wurde

In Abbildung 3.33 sind die Ergebnisse der RT-qPCR mit den Ergebnissen der jeweiligen Gene in der RNA-Sequenzierung dargestellt. Durch die Gegenüberstellung von RT-qPCR und RNA-Sequenzierung lässt sich die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit den unterschiedlichen Methoden nachvollziehen. Je homogener der Farbstreifen eines betreffenden Gens ist, desto besser reproduzierbar sind die Ergebnisse der relativen Expression für dieses Gen.

Um die Gruppe der verlässlich reproduzierten Gene einzugrenzen, wurden verschiedene Kriterien definiert. Diese waren:

1. Die Tendenz der Expressionsveränderung (Induktion/Repression) in der RNA-Sequenzierung ließ sich in der RT-qPCR mit beiden Referenzgenen reproduzieren.
2. Der FDR-korrigierte p-Wert in der RNA-Sequenzierung war kleiner 0,05.
3. Der p-Wert der nach Sidak korrigierten two-way-ANOVA in der RT-qPCR war sowohl bei Normierung auf *Tbp*, als auch bei Normierung auf *Sdha* kleiner 0,05.

Das Ergebnis dieser Auswahl war die folgende Reihe von 13 Genen, auf die alle oben genannten Kriterien zutreffen (Tabelle 3.3): *Irs1*, *Igf1r*, *Insig1*, *Elk3*, *Tbc1d4*, *Tbc1d16*, *Tbc1d31*, *Rap2a*, *Rap2b*, *Arhgef2*, *Gnai2*, *Adcy6* und *S100a10*.

## 3.4 RT-qPCR: Dosis-Wirkungs-Verhältnis auf RNA-Ebene

Im oben dargestellten Experiment hatte sich ein Effekt von Glukose auf *irs1*, nicht aber auf *Irs2* gezeigt. Ebenso war *Insig1*, nicht aber *Insig2* durch Glukose induziert worden. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurde das Expressionsverhalten dieser Gene bei unterschiedlichen Konzentrationen bestimmt. Das Ziel war, herauszufinden, ob eine Dosis-Wirkungs-Beziehung bestehe. Hierfür wurden mHypoA-2/10-Zellen für entweder 3 oder 24 Stunden bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen (0 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,2 mM) kultiviert. Anschließend wurde die relative Genexpression von *Irs1*, *Irs2*, *Insig1* und *Insig2* mit Hilfe des RT-qPCR-Verfahrens bestimmt. Bei 3 Stunden Stimulation zeigte sich für *Irs1* und *Insig1* eine von der Glukosekonzentration abhängige Expressionsstärke, während die Expression von *Irs2* und *Insig2* im Wesentlichen nicht von den angebotenen Konzentrationen beeinflusst wurde (Abbildung 3.34). Nach 24 Stunden Stimulation zeigte sich für *Irs1* und *Irs2* ein ähnlicher Effekt wie bei der dreistündigen Stimulation. Bei *Insig1* und *Insig2* hingegen zeigte sich nach 24-stündiger Stimulation nun auch ein leichter Effekt für *Insig2* (Abbildung 3.35).

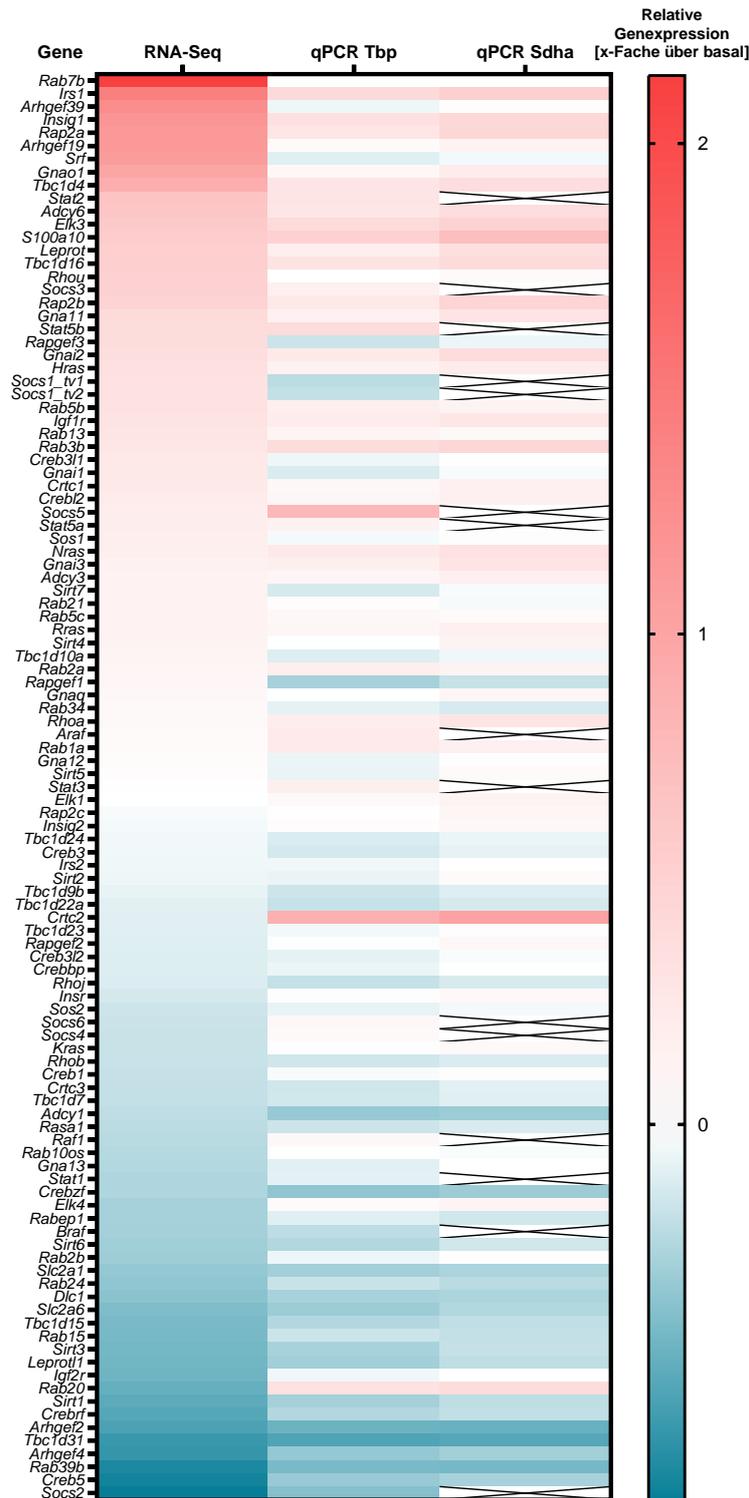


Abbildung 3.33: Vergleich von RNA-Sequenzierung und RT-qPCR

Darstellung der relativen Expression unter Glukose (2,5 mM) im Vergleich zu basal (0 mM Glukose). Farbcodierung: Je dunkler das Rot, desto stärker ist die Induktion des Gens durch Glukose, je dunkler das Blau, desto stärker ist die Repression des Gens durch Glukose. Weiß steht für keine Veränderung der Expression durch Glukose. Auf der Ordinate sind die im Rahmen der RT-qPCR untersuchten Gene aufgelistet. Die Abszisse ist in drei Abschnitte unterteilt: links die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung, mittig die der RT-qPCR normiert auf *Tbp* und rechts normiert auf *Sdha*.

Tabelle 3.3: Durch Glukose in ihrer Expression hochsignifikant beeinflusste Gene

Gene	RNA-Sequenzierung		RT-qPCR			
	Expres- sionsver- änderung [%]	FDR- korri- gierter p-Wert	Tbp		Sdha	
Expres- sionsver- änderung [%]			Sidak ANO- VA p- Wert	Expres- sionsver- änderung [%]	Sidak ANO- VA p- Wert	
<i>Irs1</i>	143	< 0,0001	41	< 0,0001	52	< 0,0001
<i>Igf1r</i>	31	< 0,0001	21	0,0243	28	0,0038
<i>Insig1</i>	118	< 0,0001	34	< 0,0001	43	< 0,0001
<i>Elk3</i>	59	< 0,0001	40	< 0,0001	50	< 0,0001
<i>Tbc1d4</i>	90	< 0,0001	29	0,0036	37	0,0002
<i>Tbc1d16</i>	53	< 0,0001	31	0,0012	40	< 0,0001
<i>Tbc1d31</i>	-62	< 0,0001	-55	< 0,0001	-53	< 0,0001
<i>Rap2a</i>	114	< 0,0001	27	0,0038	45	< 0,0001
<i>Rap2b</i>	49	< 0,0001	24	0,0203	46	< 0,0001
<i>Arhgef2</i>	-56	< 0,0001	-46	< 0,0001	-47	0,0002
<i>Gnai2</i>	37	< 0,0001	24	0,0178	39	0,0003
<i>Adcy6</i>	63	< 0,0001	28	0,0392	37	0,0071
<i>S100a10</i>	56	< 0,0001	51	< 0,0001	72	< 0,0001

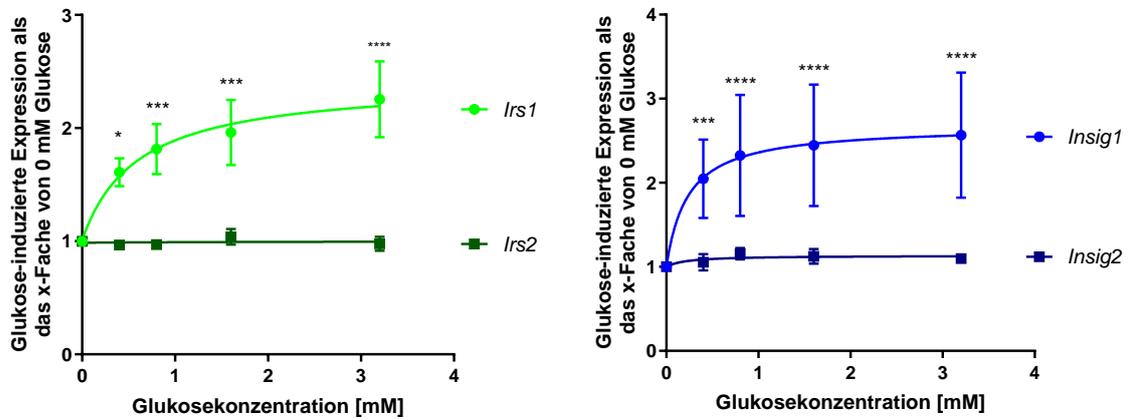


Abbildung 3.34: **RT-qPCR mHypoA-2/10 3 Stunden *Irs1/2* und *Insig1/2***  
 mHypoA-2/10-Zellen wurden für 3 Stunden bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen kultiviert. Anschließend wurde die relative Expression in Bezug auf die Expression bei 0 mM Glukose von *Irs1* und *Irs2* sowie *Insig1* und *Insig2* anhand des Referenzgens *Sdha* bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Genen wurden mittels einer two-way-ANOVA und anschließendem Sidak-Test ermittelt,  $n = 3$ .

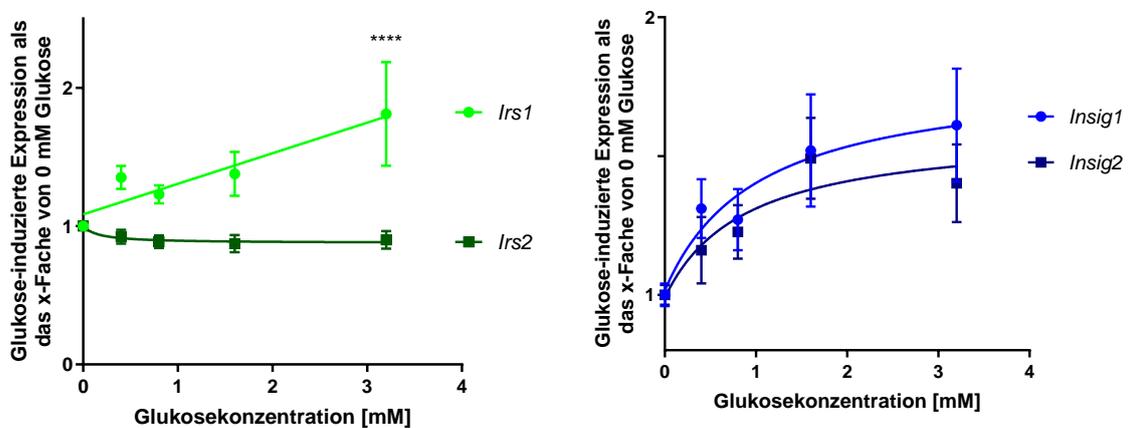


Abbildung 3.35: **RT-qPCR mHypoA-2/10 24 Stunden *Irs1/2* und *Insig1/2***  
 mHypoA-2/10-Zellen wurden für 24 Stunden bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen kultiviert. Anschließend wurde die relative Expression in Bezug auf die Expression bei 0 mM Glukose von *Irs1* und *Irs2* sowie *Insig1* und *Insig2* anhand des Referenzgens *Sdha* bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Genen wurden mittels einer two-way-ANOVA und anschließendem Sidak-Test ermittelt,  $n = 3$ .

## 3.5 Proteinnachweis: Überprüfung der Genexpression auf Proteinebene

Im nachfolgenden Schritt sollte nun untersucht werden, inwiefern sich die auf Ebene der Transkription durch RNA-Veränderungen nachgewiesenen Effekte der Glukose auf die Genexpression auch auf der Ebene der Translation durch die Beobachtung von Proteinmengenveränderungen nachweisen ließen. Zu diesem Zweck wurden Western-Blot-Untersuchungen durchgeführt. Aus finanziellen Gründen war es nicht möglich, alle Gene, die sich in der RNA-Sequenzierung und den qPCR-Analysen verlässlich als durch Glukose in ihrer Expression beeinflusst gezeigt hatten, mittels des Western-Blot-Verfahrens zu untersuchen. Daher wurde der Proteinnachweis zunächst nur für die beiden auf RNA-Ebene in den RT-qPCR-Untersuchungen am stärksten durch Glukose induzierten Gene, *Irs1* und *Insig1*, durchgeführt.

mHypoA-2/10-Zellen wurden für dieses Experiment für 24 Stunden in sechs verschiedenen Glukosekonzentrationen (0 | 0,2 | 1,5 | 2,5 | 5 | 15 mM) kultiviert. Abbildung 3.36 zeigt die Quantifizierung der im Rahmen dieses Experiments gewonnenen Western-Blot-Banden. Dargestellt ist die Bandenintensität in Relation zu SDHA in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration des Mediums. Es lässt sich erkennen, dass es zwischen 0 und 2,5 mM Glukose sowohl bei IRS1 als auch bei INSIG1 zu einer Steigerung der Protein-Expression kommt. Während die Expression bei IRS1 unter höheren Konzentrationen weiterhin ungefähr konstant bleibt, sinkt die Proteinmenge bei INSIG1 unter höheren Konzentrationen wieder ab und ist dann ungefähr genauso hoch wie unter 0 mM Glukose. Es werden also IRS1 und INSIG1 auch auf der Protein-Ebene durch Glukose induziert.

Um zu untersuchen, ob es sich bei der Glukose-induzierten Expressionsverstärkung von IRS1 um einen für die mHypoA-2/10-Zelllinie spezifischen Effekt handelte, wurde das Experiment mit der GT1-7-Zelllinie wiederholt. Wie in Abbildung 3.37 zu sehen ist, war IRS1 auch in der GT1-7-Zelllinie bei mittleren Glukosekonzentrationen von 1,5 oder 2,5 mM Glukose verstärkt exprimiert. Interessanterweise zeigte sich unter höheren Glukosekonzentrationen (5 und 15 mM) eine Verminderung der Bandenintensität. Womit das Expressionsverhalten von IRS1 in den GT1-7-Zellen dem von INSIG1 in den mHypoA-2/10-Zellen ähnelt.

### 3.5.1 Einfluss der Glukose auf die IGF-1-induzierte Phosphorylierung von ERK1/2, AKT und CREB

Im folgenden Schritt wurden mHypoA-2/10- und GT1-7-Zellen für 24 Stunden entweder bei 0,1 mM oder 2,5 mM Glukose kultiviert und anschließend für 2:30, 5, 10, 20 bzw. 30 Minuten mit IGF-1 stimuliert. Nach dem Ernten der Zellen wurden die Proteinmengen von phosphoryliertem ERK1/2, AKT und CREB semiquantitativ mittels des Western-Blot-Verfahrens bestimmt. Zur Normierung wurden die Histon-Banden herangezogen. Die auf das Histon normierten Proteinmengen wurden sodann in Relation zu den jeweiligen Proben gesetzt, die nicht mit IGF-1 stimuliert worden waren. Dadurch ließ sich die relative

Änderung der Menge an phosphoryliertem Protein in Abhängigkeit von der Zeit darstellen (siehe Abbildung 3.38). Bei den mHypoA-2/10-Zellen ließ sich für AKT und CREB kein Unterschied zwischen niedriger und hoher Glukose im Hinblick auf die Phosphorylierung feststellen. Nur bei ERK1/2 war die relative Steigerung der Phosphorylierung bei 0,1 mM Glukose stärker als bei 2,5 mM Glukose. Bei den GT1-7-Zellen wiederum (Abbildung 3.39) zeigte sich nur für CREB ein signifikanter Unterschied zwischen der relativen Steigerung der Phosphorylierung unter hoher und niedriger Glukose. Beide Male war die relative Steigerung der Phosphorylierung (einmal für ERK1/2 bei den mHypoA-2/10-Zellen und einmal für CREB bei den GT1-7-Zellen) bei den unter niedrigen Glukosekonzentrationen kultivierten Zellen höher.

### 3.6 Effekte von Glukose auf das monomere G-Protein RHO

Als Nächstes wurde der Einfluss von Glukose auf die Aktivierung von Rho untersucht. Bei RHO handelt es sich um eine kleine GTPase, die als aktiviert gilt, wenn sie GTP gebunden hat und als inaktiviert gilt, wenn sie GDP gebunden hat. Mit Hilfe des *Active Rho Pull-Down and Detection Kit* von *Thermo Fisher Scientific* wurde das aktive, d.h. GTP-gebundene RHO isoliert und anschließend mit einem Rho-Antikörper, der laut Hersteller RHOA, RHOB und RHOC bindet, mittels des Western-Blot-Verfahrens nachgewiesen.

Zunächst wurden mHypoA-2/10-Zellen in normalem DMEM, d.h. DMEM mit 25 mM Glukose, ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte dann ein Mediumwechsel, um den einen Teil der Zellen mit 0,1 mM Glukose und den anderen Teil der Zellen mit 2,5 mM Glukose zu stimulieren. Nach 24 Stunden Stimulationszeit wurde dann das aktive RHO isoliert und nachgewiesen.

In Abbildung 3.40 ist die Quantifizierung der Western-Blot-Banden dargestellt. Die Bandenfläche ist in Abhängigkeit von der Glukosebehandlung angegeben. Außerdem ist auf der Abszisse angezeigt, ob im Rahmen der Isolation eine Zugabe von GTP bzw. GDP stattgefunden hat oder nicht (basal). Wie in Abbildung 3.40 zu sehen ist, war die Bande des basalen aktiven RHO mit bloßem Auge kaum zu erkennen. Erst bei der Bildanalyse im Rahmen der Quantifizierung konnte eine kleine Menge detektiert werden. Wurde im Rahmen des Isolationsprozesses GTP oder GDP zugegeben, waren die Banden wesentlich deutlicher erkennbar, wobei nach Zugabe von GTP mehr aktives Rho nachgewiesen wurde als nach Zugabe von GDP. Allerdings ließ sich kein eindeutiger Effekt der Glukosekonzentration erkennen. Dieser Umstand und die Tatsache, dass kaum aktives RHO in der unbehandelten Probe nachzuweisen war, veranlasste dazu, die Versuchsreihe nach zwei Durchgängen abzubereiten.

### 3.7 Glukose erhöht die durch Noradrenalin induzierte cAMP-Synthese

In der RNA-Sequenzierung und RT-qPCR waren u.a. Gene durch Glukose induziert worden, die bekannt dafür sind, die cAMP-Synthese zu beeinflussen. Mit *Gnai2* war ein G-Protein induziert, welches zu einer verringerten cAMP-Synthese führt. Die Adenylatzyklase 6, die dagegen cAMP synthetisiert, war ebenfalls durch Glukose induziert. Damit waren zwei Gene identifiziert worden, die durch Glukose in ihrer Expression verstärkt wurden, aber der Theorie nach entgegengesetzte Wirkungen auf die cAMP-Menge haben. Das Ziel des im Folgenden beschriebenen Versuchs war es zu untersuchen, ob Glukose im Endeffekt zu einer vermehrten oder aber einer verringerten cAMP-Synthese führt.

Zu diesem Zweck wurden mHypoA-2/10-Zellen auf 12-Well-Platten mit je 50.000 Zellen je Well ausgesät und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte dann ein Mediumwechsel mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen. Der eine Teil der Zellen wurde einem Medium mit 0,1 mM Glukose und ein anderer Teil einem Medium mit 2,5 mM Glukose ausgesetzt. Beide Medien waren FCS-frei. Außerdem wurde den Zellen <sup>3</sup>H-Adenin mit einer finalen Konzentration von 1 µCi beigegeben, das durch Inkubation der Zellen für eine weitere Nacht in den Stoffwechsel der Zellen gelangen konnte. Am dritten Tag erfolgte dann die 10-minütige Stimulation mit Noradrenalin, α-MSH und Forskolin. Die endgültigen Konzentrationen sind in Tabelle 2.11 angegeben. Zusätzlich enthielt das Stimulationsmedium noch 25 mM HEPES zur Aufrechterhaltung eines stabilen pH-Werts und 1 mM IBMX, einen PDE-Hemmer, um den Abbau von cAMP zu verhindern.

Unter allen drei Stoffen zeigte sich eine verstärkte cAMP-Akkumulation, wobei diese bei α-MSH am schwächsten und unter Forskolin am stärksten war. Bei der basalen cAMP-Menge war, wie auch schon zuvor, eine leichte Reduktion durch Glukose zu erkennen, wobei diese nicht signifikant war. Die Noradrenalin-induzierte cAMP-Akkumulation war unter 2,5 mM Glukose um 56 % im Vergleich zu 0,1 mM Glukose induziert worden (Abbildung 3.41). Für α-MSH und Forskolin ließ sich dagegen kein signifikanter Einfluss von Glukose auf die cAMP-Akkumulation nachweisen.

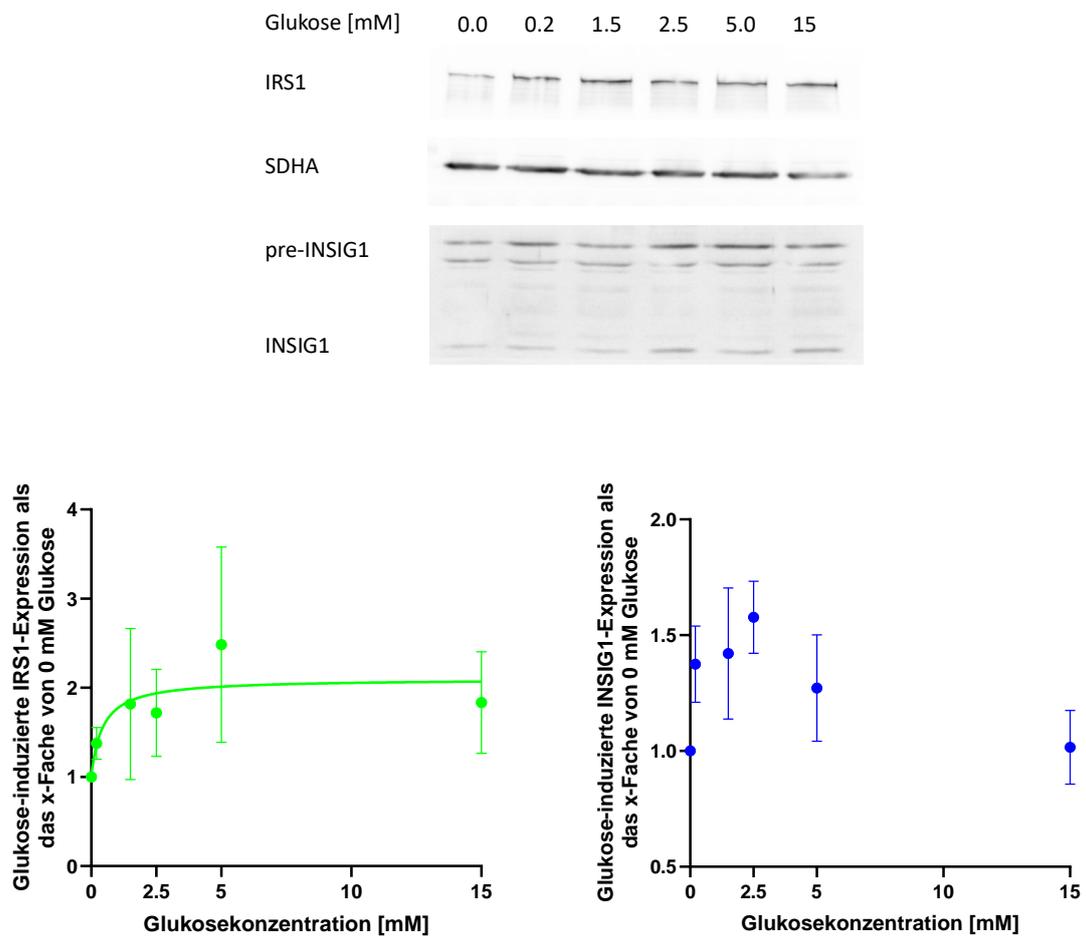


Abbildung 3.36: **Western Blot mHypoA-2/10 24 Stunden IRS1 und INSIG1**

mHypoA-2/10-Zellen wurden 24 Stunden lang in sechs verschiedenen Konzentrationen (0 | 0,2 | 1,5 | 2,5 | 5 | 15 mM) kultiviert. Anschließend wurden die Proteine INSIG1, IRS1 und SDHA mittels Western-Blot nachgewiesen. Dargestellt ist die relative Intensität der Western-Blot-Banden, normiert auf das Referenzprotein SDHA und im Verhältnis zur Expression unter 0 mM Glukose, in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration im Medium in mM. n = 4.

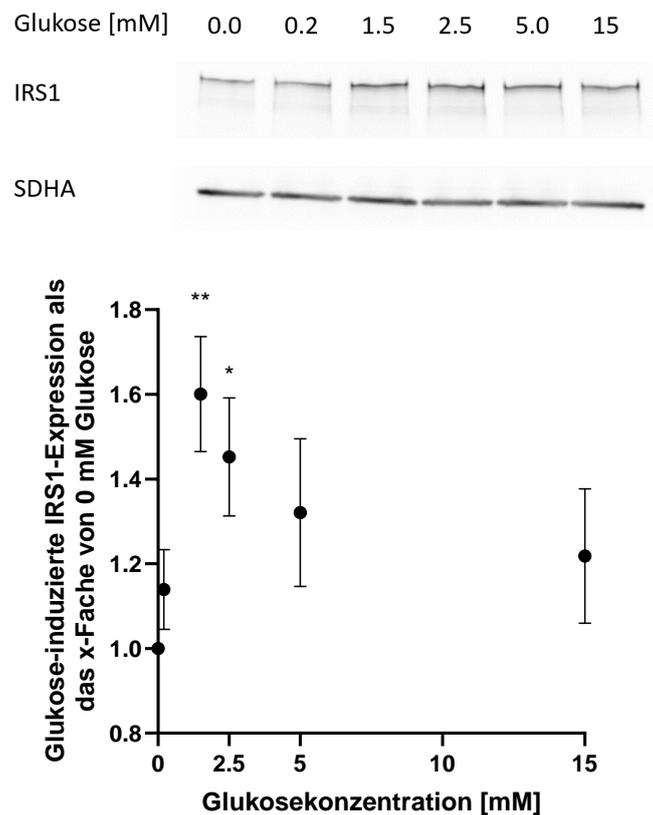


Abbildung 3.37: Western Blot GT1-7 24 Stunden IRS1

GT1-7-zellen wurden für 24 Stunden in sechs verschiedenen Glukosekonzentrationen kultiviert. Anschließend wurden die Proteine IRS1 und SDHA mittels Western-Blot nachgewiesen. Dargestellt ist die relative Intensität der Western-Blot-Banden, normiert auf das Referenzprotein SDHA und im Verhältnis zur Expression unter 0 mM Glukose, in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration in mM. Signifikante Unterschiede zu 0 mM Glukose wurden mittels two-way ANOVA und Dunnett-Test ermittelt,  $n = 3$ .

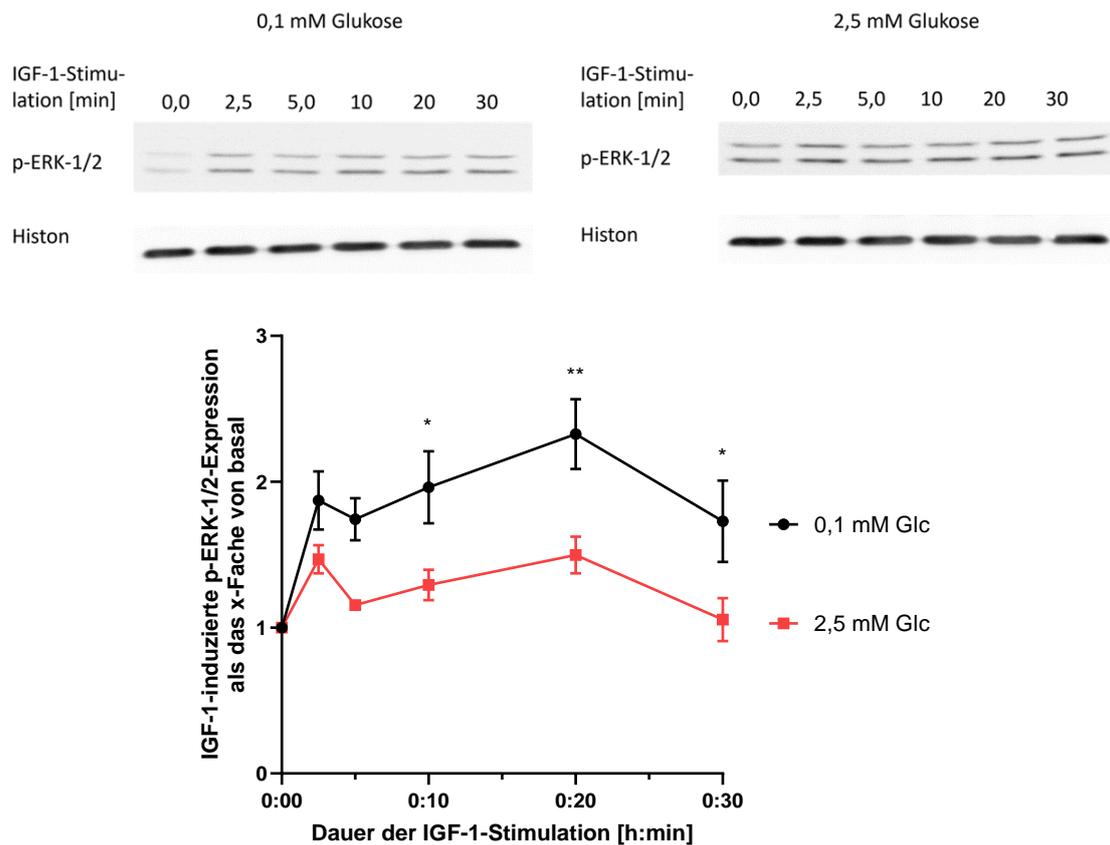


Abbildung 3.38: **Glukose-abhängige IGF-1-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung** mHypoA-1/10-Zellen wurden für 2:30, 5, 10, 20 und 30 Minuten mit IGF-1 stimuliert. Als Kontrolle dienten nicht stimulierte Zellen. Anschließend wurde die Menge an phosphoryliertem ERK1/2 in Relation zur Histon-Bande mittels des Western-Blot-Verfahrens bestimmt und auf die nicht stimulierte Probe normiert. In Schwarz sind die Zellen dargestellt, die für 24 Stunden mit 0,1 mM Glukose stimuliert wurden und in Rot diejenigen, welche mit 2,5 mM Glukose stimuliert wurden. Mittels two-way ANOVA wurden signifikante Unterschiede ermittelt, welche bei 10, 20 und 30 Minuten zu erkennen sind,  $n = 7$ .

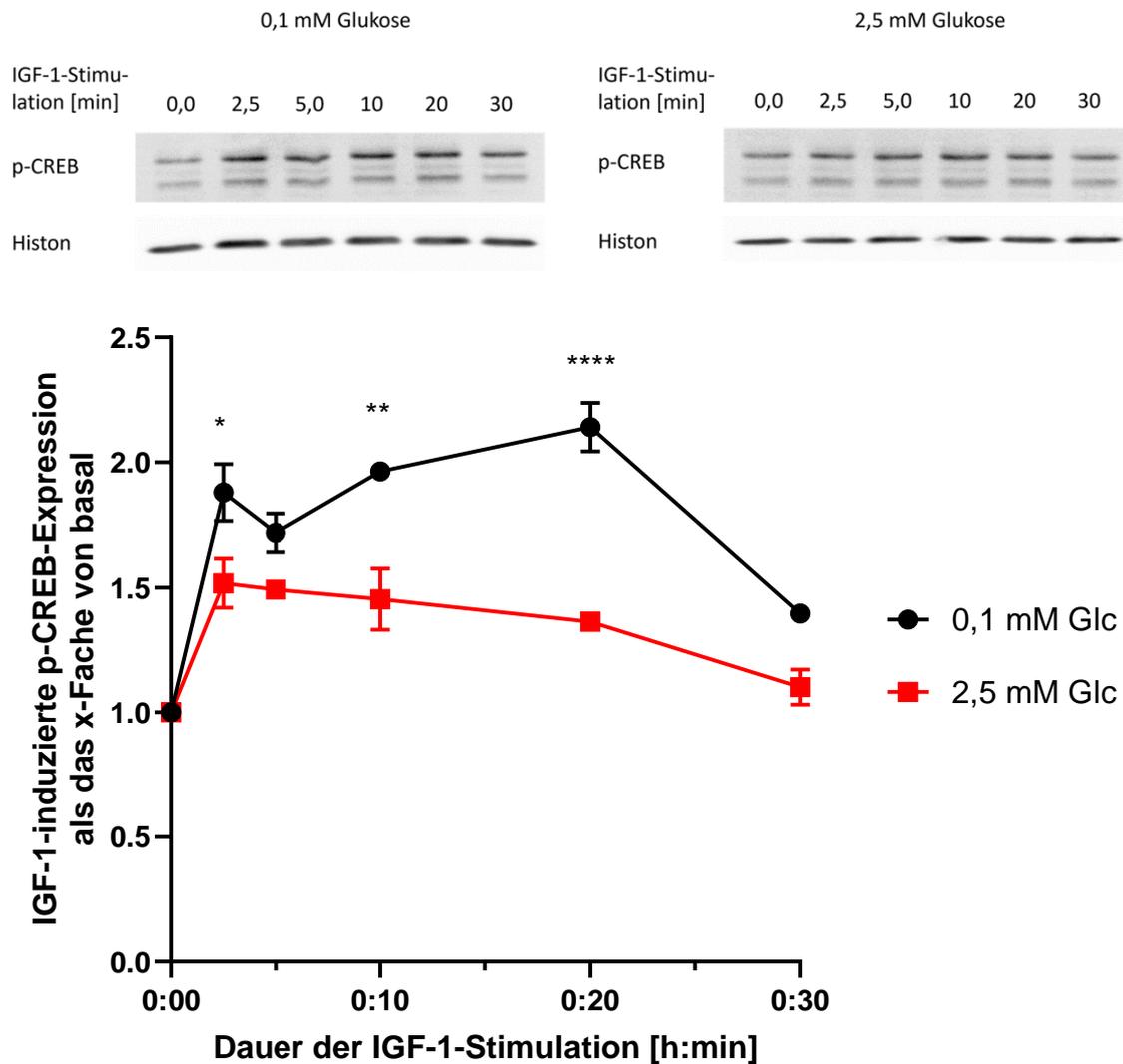


Abbildung 3.39: **Glukose-abhängige IGF-1-induzierte CREB-Phosphorylierung**  
 GT1-7-Zellen wurden für 2:30, 5, 10, 20 und 30 Minuten mit IGF-1 stimuliert. Als Kontrolle dienten nicht stimulierte Zellen. Anschließend wurde die Menge an phosphoryliertem CREB in Relation zur Histon-Bande mittels des Western-Blot-Verfahrens bestimmt und auf die nicht stimulierte Probe normiert. In Schwarz sind die Zellen dargestellt, die für 24 Stunden mit 0,1 mM Glukose stimuliert wurden und in Rot diejenigen, welche mit 2,5 mM Glukose stimuliert wurden. Mittels two-way ANOVA wurden signifikante Unterschiede ermittelt, welche bei 2,5 sowie 10 und 20 Minuten zu erkennen sind, n = 2.

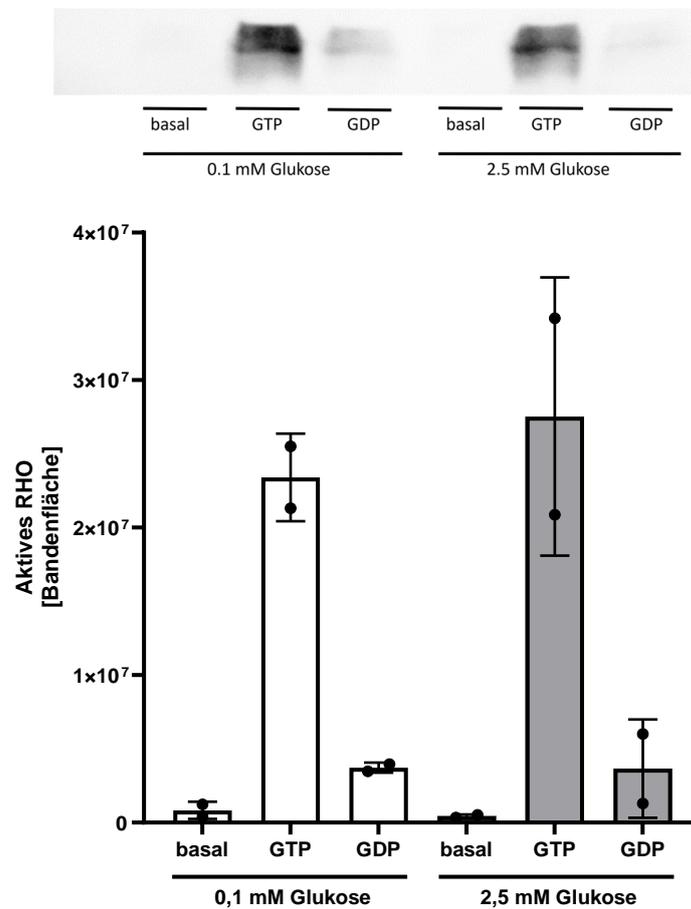


Abbildung 3.40: **Glukoseabhängige RHO-Aktivität**

mHypoA-2/10-Zellen wurden für 24 Stunden entweder mit 0,1 mM Glukose oder 2,5 mM Glukose stimuliert. Anschließend wurde das aktive RHO bestimmt. Darstellung der Menge des aktiven RHO in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration und der Zugabe von GTP, GDP oder ohne Zusatz,  $n = 2$ .

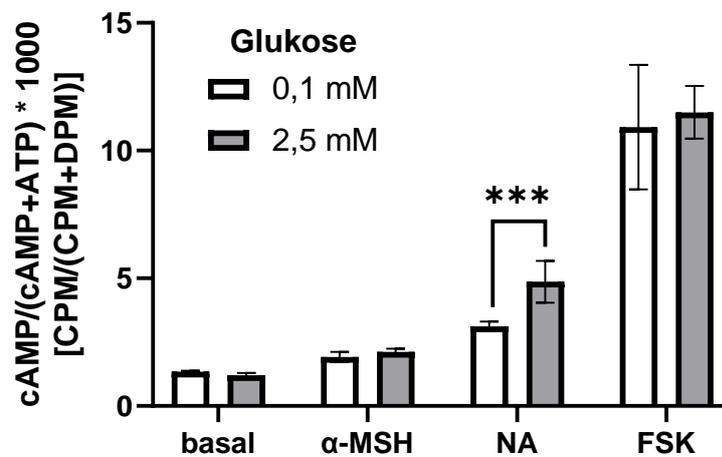


Abbildung 3.41: cAMP-Akkumulation in Abhängigkeit von Glukose,  $\alpha$ -MSH, Noradrenalin und Forskolin

mHypoA-2/10-Zellen wurden für 24 Stunden bei 0,1 bzw. 2,5 mM Glukose inkubiert. Danach erfolgte eine 10-minütige Stimulation mit wahlweise  $\alpha$ -MSH, Noradrenalin bzw. Forskolin. Anschließend wurde die cAMP-Akkumulation mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillationszählers gemessen. Die Graphik zeigt die normierte cAMP-Akkumulation ( $= \frac{\text{cAMP}}{\text{cAMP} + \text{ATP}} \cdot 1000$ ) in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration im Medium (0,1 mM oder 2,5 mM) und der Stimulation mit  $\alpha$ -MSH, Noradrenalin (NA) bzw. Forskolin (FSK). Signifikante Unterschiede wurden mittels two-way ANOVA ermittelt (NA 0,1 mM vs. NA 2,5 mM Glukose  $p = 0,0003$ ),  $n = 3$ .



# Kapitel 4

## Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Glukose einen deutlichen Einfluss auf die Expression verschiedenster Genfamilien in hypothalamischen mHypoA-2/10-Zellen ausübt. Diese Effekte ließen sich sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene nachweisen. Im Rahmen der RNA-Sequenzierung zeigten sich 641 Gene um mindestens den Faktor 2 hoch und 766 herunterreguliert. In der durchgeführten Signal- und Biosyntheseweg-Analyse war der Cholesterin-Biosyntheseweg neben diversen anderen der am stärksten durch Glukose induzierte Signal- und Biosyntheseweg. Über 100 ausgewählte Vertreter wichtiger Gengruppen, die für den Zellstoffwechsel und die Signaltransduktion von Bedeutung sind, wurden anschließend mittels RT-qPCR näher untersucht. Das Ergebnis waren 13 Gene aus unterschiedlichsten Genfamilien (*Irs1*, *Igf1r*, *Insig1*, *Elk3*, *Tbc1d4*, *Tbc1d16*, *Tbc1d31*, *Rap2a*, *Rap2b*, *Arhgef2*, *Gnai2*, *Adcy6*, *S100a10*), welche hochsignifikant in ihrer Expression durch Glukose beeinflusst wurden, was bislang für diese Gene in hypothalamischen Zellen noch nie nachgewiesen worden war. Für IRS1 und INSIG1 konnte die Induktion durch Glukose auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass unter niedrigen Glukosekonzentrationen IGF-1 zu einer relativ verstärkten Phosphorylierung von ERK1/2 und CREB führt. Doch nicht nur Proteine der Singaltransduktion wurden durch die Glukosekonzentration des Nährmediums beeinflusst. Auch für den *Second messenger* cAMP wurde eine verstärkte Noradrenalin-induzierte Akkumulation unter Glukose nachgewiesen.

In der sich nun anschließenden Diskussion werden die einzelnen Ergebnisse prägnant rekapituliert und sodann vor dem Hintergrund der bestehenden Literatur interpretiert. Dabei wird zum einen beleuchtet werden, über welche Mechanismen Glukose Einfluss auf die Genexpression nimmt und zum anderen, welche Bedeutung die Glukose-induzierte Genexpression für die Pathophysiologie von Diabetes mellitus und Metabolischem Syndrom haben könnte. Schließlich werden noch die Limitationen der vorliegenden Arbeit diskutiert. Empfehlungen für weiterführende Forschungen und eine Zusammenfassung der besprochenen Inhalte schließen die Diskussion ab.

## 4.1 Glukose induziert differenzierte Genexpression auf Ebene der Transkription

Glukose spielt eine wichtige Rolle als Nährstoff und seine erhöhte Konzentration im Blut bei Diabetes mellitus ist das Hauptproblem dieser Erkrankung. Die Insulinresistenz sowie die verschiedensten Wirkungen des Insulins, u.a. auch auf die Genexpression, sind intensiv von der Forschungsgemeinde untersucht worden. Direkte Einflüsse der Glukose auf die Genexpression wurden allerdings weniger intensiv erforscht, besonders im Hinblick auf die Genexpression in hypothalamischen Neuronen. Genexpression ist ein komplexer Vorgang, der in mehrere Abschnitte unterteilt werden kann, die wiederum von unterschiedlichsten Faktoren beeinflusst werden. Grob untergliedert, ergibt sich eine Zweiteilung der Genexpression in Transkription, bei der der genetische Code der DNA abgelesen und RNA synthetisiert wird, sowie in Translation, bei der mithilfe der RNA ein Protein synthetisiert wird. Um in einem ersten Schritt zu untersuchen, ob unterschiedliche Glukosekonzentrationen einen Einfluss auf die Genexpression haben, wurden zunächst Experimente auf der ersten Ebene, der Ebene der Transkription, durchgeführt. Zur Bestimmung von RNA-Mengen stehen verschiedenste Methoden zur Verfügung, die sich in ihrem Aufwand und damit auch ihren Kosten z.T. erheblich unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit wurde sich für zwei verschiedene Methoden entschieden, um die Ergebnisse vergleichen und gegebenenfalls validieren zu können. Die erste umfassendere und damit aufwendigere sowie kostspieligere Methode, die zur Anwendung kam, war die RNA-Sequenzierung. Hierbei wurden die RNA-Mengen von sechs verschiedenen Kulturplatten, von denen je drei bei 0 mM und drei bei 2,5 mM Glukose für drei Stunden kultiviert worden waren, für jedes Gen des murinen Erbguts bestimmt. Durch eine umfassende Analyse wurden differenziert exprimierte Gene identifiziert. Eine höhere Glukosekonzentration im Nährmedium der Zellen führte nicht zu einer undifferenzierten Erhöhung der RNA-Mengen des Erbguts, sondern einzelne Gene zeigten eine erhöhte, andere wiederum eine verringerte RNA-Menge. Unterschiedliche Glukosekonzentrationen führen also auf Ebene der Transkription zu einer differenzierten Veränderung der Genexpression einzelner Gene. Eine differenzierte, durch Glukose induzierte Genexpression, wurde auch von Ottosson-Laakso *et al.* (2017) beschrieben. Hierbei kamen allerdings humane Zellen, nämlich pankreatische Inselzellen diabetischer und nicht diabetischer Körperspender zum Einsatz und nicht, wie bei der vorliegenden Arbeit, murine immortalisierte hypothalamische Zellen. Auch war die Stimulationszeit mit 24 Stunden wesentlich länger als die der vorliegenden Arbeit von drei Stunden. Auch Nishitani *et al.* (2019) konnten eine differenzierte Genexpression, verursacht durch Glukose, nachweisen. Allerdings wurden dort murine Trophoblasten-Stammzellen verwendet, die für vier Tage, und damit deutlich länger als die Zellen in der vorliegenden Arbeit, mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen behandelt wurden. Jang *et al.* (2017) untersuchten mittels RT-qPCR die Genexpression von POMC, NPY und AgRP im murinen Hypothalamus in Abhängigkeit der Futterzusammensetzung und stellten unterschiedliche Einflüsse von Kalorienmenge und Fettzusammensetzung auf die genannten drei Gene fest. Interessanterweise waren *Pomc*, *Npy* und *AgRP* in der RNA-Sequenzierung der vorliegenden Arbeit

nicht relevant exprimiert (RPKM < 1). Aufgrund der genannten Unterschiede der zitierten Forschungen zu der vorliegenden Arbeit ist ein direkter Vergleich nicht möglich. Es lässt sich jedoch festhalten, dass Glukose in verschiedensten Zelltypen Einfluss auf die Genexpression nimmt und sich die Beeinflussbarkeit der Genexpression nicht auf die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten hypothalamischen Zellen beschränkt.

## 4.2 Glukose induziert den Cholesterin-Biosyntheseweg

In der Analyse der Signal- und Biosynthesewege hatte sich die Cholesterinbiosynthese als der auf RNA-Ebene am stärksten induzierte Biosyntheseweg ergeben. Insgesamt waren 5 Enzyme stark durch Glukose induziert worden: *Dhcr7*, *Acat2*, *Mvk*, *Hsd17b7* und *Hmgcs1*. Somit kann von einer Induktion des Cholesterin-Biosynthesewegs durch Glukose gesprochen werden. Die Stoffwechselwege der Cholesterinbiosynthese und der Glykolyse sind eng mit einander verbunden. Das im Rahmen der Glykolyse entstehende Pyruvat wird in Acetyl-CoA umgewandelt und dient sodann als Substrat für die Biosynthese von Cholesterin. Die vorliegenden Daten bedeuten somit, dass Glukose seine eigene Verstoffwechslung zu Cholesterin durch die Hochregulation der entsprechenden Enzyme induziert.

Laut Dietschy & Turley (2001) ist das Gehirn das Organ mit dem meisten Cholesterin und beinhaltet ca. 25% des gesamten Cholesterins des menschlichen Körpers. Aufgrund der Undurchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für Cholesterin muss das Gehirn sein Cholesterin selbst synthetisieren. Die Hirn-eigene Cholesterin-Synthese kann durch Insulin beeinflusst werden. Suzuki *et al.* (2010) konnten zeigen, dass in diabetischen Mausmodellen die Enzyme der Cholesterin-Biosynthese, wie auch die zerebrale Cholesterin-Konzentration selbst, reduziert sind. Auf den ersten Blick mag dies im Widerspruch zu den hier vorliegenden Daten stehen. Allerdings ist dabei zu bedenken, dass beim von Suzuki *et al.* (2010) verwendeten Mausmodell eine über mehrere Tage anhaltende diabetische Stoffwechsellage simuliert wurde, wohingegen in der vorliegenden Arbeit die Stimulation mit Glukose nur drei Stunden betrug. Längerfristig erhöhte Glukose-Konzentrationen scheinen einen gegensätzlichen Effekt zu haben. Denkbar wäre eine "Erschöpfung" der Cholesterin-Biosynthese ähnlich der erst erhöhten und dann im Verlauf der Erkrankung reduzierten Insulinproduktion beim Diabetes mellitus Typ 2.

Zu Ergebnissen, welche dagegen denen der vorliegenden Arbeit ähneln, kamen Sun *et al.* (2014) bei der Untersuchung pankreatischer Inselzellen von Ratten. Unter etwas höheren Glukosekonzentrationen (3,3 und 16,7 mM) und längeren Stimulationszeiten (24 Stunden) wurden u.a. ebenfalls *Dhcr7*, *Mvk* und *Hmgcs1* als Glukose-abhängige Enzyme der Cholesterinbiosynthese identifiziert. Abgesehen von den sich leicht unterscheidenden Versuchsbedingungen, scheint die in der vorliegenden Arbeit festgestellte Glukose-Abhängigkeit der Genexpression der Cholesterin-Biosynthese-Enzyme somit in Übereinstimmung mit speziesspezifischen und gewebeübergreifenden, grundlegenden zellulären Mechanismen zu stehen.

Der auf RNA-Ebene beobachtete Effekt, dass Glukose die Gene der Cholesterin-Biosynthese induziert, korreliert mit gesteigerten Cholesterinkonzentrationen im Überstand von mHypoA-2/10-Zellen, die unter höheren Glukosekonzentrationen (2,5 mM) kultiviert wur-

den (Webert *et al.*, 2022). Dies ist im Hinblick auf das Metabolische Syndrom interessant, da bei den betroffenen Patienten ja nicht nur erhöhte Blutzuckerwerte, sondern auch meist eine Dyslipidämie festgestellt wird (Zimmet *et al.*, 2005), die in der Regel mit erhöhten *non-HDL*-Cholesterinwerten einhergeht (Huang *et al.*, 2008).

### 4.3 IRS1 und INSIG1 sind verlässlich Glukose-abhängig exprimiert

IRS1 spielt eine bedeutende Rolle bei der Signaltransduktion von Insulin. Sowohl in der RNA-Sequenzierung, als auch in der RT-qPCR und in den Proteinnachweisen mittels Western-Blot zeigte sich eine durch die Variation der Glukosekonzentration im Medium beeinflussbare Expression von IRS1. Auf Proteinebene konnten diese Ergebnisse nicht nur in mHypoA-2/10-Zellen nachgewiesen werden, sondern auch in den ebenfalls hypothalamischen GT1-7-Zellen bestätigt werden. Diese Beobachtungen legen nahe, dass es sich hierbei weniger um einen Zelllinien-spezifischen Effekt handelt, der auf mHypoA-2/10-Zellen beschränkt ist, sondern viel mehr um ein globales Phänomen des murinen Hypothalamus. Im Hinblick auf die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 spielt IRS1 eine besondere Rolle, da es als ein Schlüsselprotein bei der Entwicklung einer Insulinresistenz gilt (Zick, 2005). Vermehrter Abbau oder Inaktivierung über Phosphorylierung von IRS1 führen über eine gestörte Insulin-Signaltransduktion schließlich zur Insulinresistenz. Dass Glukose bei kurzfristiger Stimulation über 3 bis 24 Stunden zu einer vermehrten Expression von IRS1 führt deutet darauf hin, dass Glukose zunächst zu einer Sensibilisierung der Insulin-Signaltransduktion führt, möglicherweise um die Zelle zu befähigen, mit dem Überangebot an Glukose zurechtzukommen. Die Ausbildung einer Insulinresistenz dagegen steht im Zusammenhang mit chronischen Veränderungen und längerfristigen Erhöhungen der Glukosekonzentrationen im Körper.

INSIG1 war ebenfalls nicht nur auf RNA-Ebene, sondern auch auf Proteinebene durch Glukose induziert worden. Dabei war die Glukoseabhängigkeit der INSIG1-Expression auf mittlere Glukosekonzentrationen beschränkt, wohingegen unter höheren Glukosekonzentrationen (15 mM) eine ähnlich niedrige Expression wie unter 0 mM Glukose zu beobachten war. Die Glukose-induzierte INSIG1-Expression ist insbesondere in Zusammenschau mit der durch Glukose gesteigerten Cholesterin-Biosynthese interessant. Wie bereits im Ergebnisteil erläutert verhindert INSIG1 bei hohen Cholesterin-Konzentrationen die Transkription des LDL-Rezeptors und fördert den Abbau des Schlüsselenzyms der Cholesterin-Biosynthese (Gong *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006). Während Glukose also auf der einen Seite die Biosynthese von Cholesterin durch vermehrte Expression der entsprechenden Enzyme fördert, führt es gleichzeitig zu einer gesteigerten Expression eines Proteins, welches an der negativen Regulation der Cholesterin-Biosynthese beteiligt ist. Die Förderung des einen Prozesses geht also gleichzeitig mit dessen Begrenzung durch einen antagonistischen Prozess einher. Möglicherweise dient dies dazu, kurzfristig eine überschießende Cholesterinproduktion zu verhindern. Sollte dieser Sicherungsmechanismus langfristig außer Kraft

gesetzt werden, z.B. durch eine Gewöhnung oder Ermüdung, wäre dies ein weiterer Erklärungsansatz für den pathologisch veränderten Fettstoffwechsel beim metabolischen Syndrom.

## **4.4 Glukose vermindert die IGF-1-induzierte Menge von phospho-ERK in mHypoA-2/10-Zellen und phospho-CREB in GT1-7-Zellen**

ERK (*Extracellular-signal-regulated kinase*) ist Teil der Familie der *Mitogen-activated protein Kinases* (MAPK). Seine Aktivierung mittels Phosphorylierung führt zu unterschiedlichsten Effekten auf zellulärer Ebene, zu denen u.a. die Beeinflussung der Transkription, des Zellüberlebens und der Zellteilung gehören. Diverse Moleküle können zu einer ERK-Aktivierung führen, u.a. Insulin (Boulton *et al.*, 1991; Ramos, 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden mHypoA-2/10-Zellen über 24 Stunden entweder in Medium mit 0,1 mM (basal) oder 2,5 mM Glukose kultiviert und anschließend für 2½, 5, 10, 20 und 30 Minuten mit *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1) stimuliert. In Übereinstimmung mit der o.g. Literatur zeigte sich durch die IGF-1-Stimulation ein relativer Anstieg der phosphorylierten ERK-Menge im Vergleich zur Kontrolle, die nicht mit IGF-1 stimuliert wurde. Dies galt allerdings nur für die Zellen, die bei 0,1 mM Glukose kultiviert worden waren. Bei 2,5 mM ließ sich dieser Effekt zwar an den Wester-Blot-Banden erahnen, im Rahmen der Quantifizierung war er jedoch nicht signifikant. Insgesamt war allerdings eine erhöhte Menge an phosphoryliertem ERK unter 2,5 mM Glukose festzustellen. Glukose führt also insgesamt zu einer vermehrten Aktivierung von ERK, wodurch der relative Effekt von IGF-1 auf die ERK-Phosphorylierung unter höheren Glukosekonzentrationen abgeschwächt wird. Eine Glukose-induzierte ERK-Aktivierung konnten auch Liu *et al.* (2016) zeigen. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurden allerdings Schwann-Zellen von Ratten verwendet, die auch deutlich länger (bis zu 96 Stunden) und in deutlich höheren (25-150 mM) Glukosekonzentrationen kultiviert wurden. Es lässt sich also festhalten, dass die Beobachtungen vom Prinzip her in Übereinstimmung mit der Literatur stehen, aber im Lichte der jeweiligen besonderen Versuchsbedingungen gesehen werden müssen. Eine funktionelle Konsequenz aus diesen Ergebnissen zu ziehen ist schwierig, da eine Aktivierung von ERK je nach Zelllinie unterschiedliche Effekte nach sich zieht. So kann eine ERK-Aktivierung auf der einen Seite die Zellproliferation fördern, während es auf der anderen Seite zur Apoptose führt (McCubrey *et al.*, 2007). Im Hinblick auf die durch ERK vermittelte Steigerung der Proliferation sei darauf hingewiesen, dass eine starke Assoziation zwischen Diabetes mellitus und diversen Krebsformen besteht (Giovannucci *et al.*, 2010). Der genaue Zusammenhang ist nicht abschließend geklärt. Clemmons *et al.* (2007) konnten jedoch eine durch Hyperglykämie verursachte Steigerung der Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen auf Grundlage einer veränderten IGF-1-Signalvermittlung feststellen. Die im Rahmen dieser Arbeit festgestellte Beeinflussung der IGF-1-Signalverarbeitung und Aktivierung von ERK ist ein weiterer Hinweis in die potenziell Proliferations-fördernde Wirkung

von Glukose.

CREB (*cAMP response element-binding protein*) ist ein Transkriptionsfaktor, der an das *cAMP response element* (CRE) bindet (Montminy & Bilezikjian, 1987). Die Phosphorylierung von CREB führt zu dessen Dimerisation und Aktivierung in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor (Yamamoto *et al.*, 1988). Darüber hinaus ist bekannt, dass der *Insulin-like growth factor I* zu einer Aktivierung von CREB führt (Pugazhenti *et al.*, 1999). Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, wie die in dieser Arbeit angewendeten Glukosekonzentrationen die CREB-Aktivität beeinflussen. Zur Beantwortung dieser Frage wurden mHypoA-2/10- und GT1-7-Zellen nach demselben Schema wie oben kultiviert und das phosphorylierte CREB mittels Western-Blot bestimmt. Dabei zeigte sich, dass IGF-1 insbesondere zwischen 2,5 und 20 Minuten zu einer Erhöhung des phosphorylierten *Creb* führte. Bei den GT1-7-Zellen war darüber hinaus ein Unterschied zwischen den Glukosekonzentrationen zu beobachten. Es zeigte sich ein relativ stärkerer Effekt von IGF-1 bei der niedrigeren Glukosekonzentration von 0,1 mM im Vergleich zur höheren von 2,5 mM Glukose. Unter basalen Bedingungen war ähnlich wie bei ERK eine Steigerung der Menge an phosphoryliertem CREB durch Glukose zu beobachten. Dass Glukose zu einer Steigerung von phosphoryliertem CREB führt, beschrieben auch Morris & Gold (2013) bei ihren Experimenten mit Ratten. Die Glukose-induzierte Phosphorylierung von CREB ist ein möglicher Mechanismus, über den Glukose die Expression weiterer Gene beeinflusst, welche ein CRE in ihrer Promotorregion aufweisen. Darüber hinaus wird die Aktivierung von CREB auch in der Literatur als eine Komponente der Pathologie des Diabetes mellitus Typ 2 und mögliches Ziel antidiabetischer Therapien angesehen (Benchoula *et al.*, 2021).

## 4.5 Einfluss von Glukose auf die RHO-Aktivität bleibt unklar

Unter höheren Glukosekonzentrationen (5,5 und 30 mM) konnten Kawamura *et al.* (2004) zeigen, dass Glukose über die Proteinkinase C zu einer verstärkten Aktivität von RHO führt. Kawamura *et al.* (2004) detektierten das aktive RHO ebenfalls mittels Präzipitation und Western-Blot. Unter den im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Glukosekonzentrationen von 0,1 und 2,5 mM war dagegen kein eindeutiger Effekt von Glukose nachzuweisen. Dies könnte zum einen an einem Problem mit dem verwendeten *Detection Kit* liegen, da sich weder unter 0,1 noch unter 2,5 mM Glukose in den unbehandelten Proben, d.h. den Proben, denen im Rahmen des Isolationsprozesses weder GTP noch GDP zugegeben wurde, nur unbedeutende, kaum erkennbare Mengen von aktivem RHO detektieren ließen. Erst die Zugabe von GTP oder GDP im Verlauf des Isolationsprozesses führte zu einer relevanten Detektion von aktivem RHO. Zum anderen ist es möglich, dass unter den wesentlich geringeren Glukosekonzentrationen, die in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kamen, generell kaum aktives Rho vorliegt. Leider lässt sich somit anhand der vorliegenden Daten nicht sagen, welchen Einfluss Glukose auf die RHO-Aktivität hat.

## 4.6 Glukose verstärkt Noradrenalin-abhängige cAMP-Akkumulation

cAMP entsteht mit Hilfe der Adenylatzyklase aus ATP und dient als wichtiger *Second Messenger* bei der Signaltransduktion. Die unspezifischen Phosphodiesterasen der Familien 1, 2, 3, 10 und 11 sowie die cAMP-spezifischen Phosphodiesterasen der Familien 4, 7 und 8 bauen das cAMP wiederum zu AMP ab. Es erscheint somit einleuchtend, dass die zellulären cAMP-Mengen ganz wesentlich von den Mengen der sie produzierenden und abbauenden Enzyme abhängig sind.

Von den zehn bekannten und in der RNA-Sequenzierung untersuchten Adenylatzyklasen (*Adcy1-10*) waren nur vier exprimiert (*Adcy1, 3, 6, 9*, Abbildung 4.1), d.h. sie wiesen unter einer der Versuchsbedingungen einen RPKM-Wert  $\geq 1$  auf. Von diesen vier wiederum war die Adenylatzyklase 6 (*Adcy6*) die am stärksten exprimierte und die einzige, die in ihrer Expression durch Glukose signifikant verändert wurde (im Mittel von 11,5 RPKM auf 18,8 RPKM, dies entspricht einer Induktion von ca. 63%). Von den vier in der RNA-Sequenzierung nachgewiesenen Adenylatzyklasen wurden anschließend drei (*Adcy1, 3, 6*) mit Hilfe der RT-qPCR näher untersucht. Hierbei ließ sich die Induktion von *Adcy6* durch Glukose in abgeschwächter Form reproduzieren. Es kann daher von einer verlässlichen Steigerung der Transkription der Adenylatzyklase 6 durch Glukose nach drei Stunden ausgegangen werden. Die relevanteste, da mit Abstand am stärksten exprimierte, Adenylatzyklase ist damit auch diejenige, welche sicher durch Glukose induziert ist. Dies würde dafür sprechen, dass auf Seiten der cAMP-Produktion mit einer Steigerung durch Glukose zu rechnen ist.

Von den "Gegenspielern" der Adenylatzyklasen, den Phosphodiesterasen, die cAMP (spezifisch oder unspezifisch) abbauen, waren sechs exprimiert, d.h. wiesen einen RPKM-Wert unter wenigstens einer Versuchsbedingung von mindestens 1 auf: *Pde1a, Pde3b, Pde4a, Pde4b, Pde7a, Pde8a* (Abbildung 4.2). *Pde1a* und *Pde3b* (beides unspezifische Phosphodiesterasen) waren von diesen die basal am stärksten exprimierten Gene mit mittleren RPKM-Werten von 4,6 und 7. Beide wurden durch Glukose in ihrer Expression deutlich vermindert, *Pde1a* um ca. 36 %, *Pde3b* um ca. 40 %. Bis auf *Pde4b* (einer cAMP-spezifischen Phosphodiesterase), dessen basale Expression durch Glukose von 1,8 RPKM auf 2,4 RPKM angehoben wurde, waren die restlichen Phosphodiesterasen nicht signifikant durch Glukose beeinflusst. Insgesamt kann also von einer Verminderung der Transkription von cAMP-spezifischen und -unspezifischen Phosphodiesterasen gesprochen werden. Zugrunde gelegt, dass sich dieser Effekt auch auf translationaler Ebene durchsetzt, wäre vor diesem Hintergrund ein verminderter Abbau von cAMP unter Glukose zu erwarten.

Es lässt sich also festhalten, dass Glukose auf der einen Seite die Expression der dominanten Adenylatzyklase 6 deutlich verstärkt und auf der anderen Seite die Phosphodiesterasen insgesamt vermindert. Folgerichtig wäre eine erhöhte cAMP-Menge unter Glukose zu erwarten. Betrachtet man jedoch die Ergebnisse der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten cAMP-Messungen (Abbildung 3.41), so scheint unter basalen Bedingungen sogar eher das Gegenteil der Fall zu sein: Glukose allein hat hier keinen Einfluss

auf die gemessene cAMP-Menge. Erst bei Stimulation mit Noradrenalin macht sich ein Effekt bemerkbar und es ist eine verstärkte cAMP-Akkumulation unter der höheren Glukosekonzentration zu erkennen. Es ist also ein äußerer Stimulus notwendig, damit sich die Expressionsveränderungen auch funktional bemerkbar machen.

Nun stellt sich jedoch die Frage, warum Glukose Einfluss auf die Noradrenalin-Wirkung im Hinblick auf cAMP nimmt. Betrachtet man die bei der Signaltransduktion des Noradrenalins wichtigen G-Proteine, können diese die beobachteten Phänomene allerdings nicht erklären. Während *Gnas*, welches die Adenylatzyklase aktiviert, nicht signifikant durch Glukose verändert war, kam es eher zu einer verstärkten Expression der inhibitorischen G-Proteine *Gnai1* und insbesondere des am stärksten exprimierten G-Proteins *Gnai2*, ebenfalls ein inhibitorisches G-Protein (Abbildung 4.3).

Erst der Blick auf die Adrenorezeptoren lässt eine plausible Erklärung zu. Denn der einzige in den mHypoA-2/10-Zellen exprimierte Adrenorezeptor (mit einem RPKM-Wert  $\geq 1$ ), der  $\beta_2$ -Adrenorezeptor (*Adrb2*), ist nicht nur ein  $G_s$ -gekoppelter Rezeptor, sondern auch stark, nämlich um 170 %, durch Glukose in seiner Expression induziert (Abbildung 4.4). Die Kombination aus stark induziertem  $\beta_2$ -Adrenorezeptor, deutlich induzierter Adenylatzyklase 6 und reduzierten Phosphodiesterasen lässt eine verstärkte cAMP-Akkumulation bei Noradrenalin-Stimulation nunmehr als logische Konsequenz erscheinen. Die Glukose-abhängige Expression des  $\beta_2$ -Adrenorezeptors und die durch Glukose beeinflusste cAMP-Antwort auf Noradrenalin sind auch dahingehend interessant, da es genetische Polymorphismen des Rezeptors gibt, die im Zusammenhang mit Diabetes mellitus Typ 2 (Chang *et al.*, 2002) sowie Adipositas und Stoffwechselveränderungen stehen (Lima *et al.*, 2007).

Die  $\alpha$ -MSH- und Forskolin-induzierte cAMP-Akkumulation war im Gegensatz hierzu nicht durch Glukose beeinflusst worden. Diese Unabhängigkeit von Glukose könnte an den unterschiedlichen Wirkungsweisen dieser Stoffe liegen.  $\alpha$ -MSH wirkt über die Melanocortin-Rezeptoren, von denen in der RNA-Sequenzierung keiner RPKM-Werte über 1 zeigte. Es ist also von einer geringer Melanocortin-Rezeptor-Dichte auszugehen. Dies könnte auch den geringen beobachteten Effekt von  $\alpha$ -MSH auf die cAMP-Akkumulation erklären, die sich nicht wesentlich von den basalen Bedingungen unterschied. Forskolin dagegen, führte zu einer deutlichen Steigerung der cAMP-Akkumulation im Vergleich zu den basalen Bedingungen. Die Forskolin-induzierte cAMP-Akkumulation war stärker als unter allen anderen Versuchsbedingungen. Da Forskolin ein direkter Aktivator der Adenylatcyclase (Seamon *et al.*, 1981) ist, sich jedoch kein Glukose-Effekt beobachten ließ, scheint die Glukose-induzierte Induktion der Adenylatzyklase 6 hier keine Rolle zu spielen.

Bei all diesen Betrachtungen darf natürlich nicht außer Acht gelassen werden, dass auf Ebene der Transkription ein 3-stündiges und auf Ebene der Funktionalität ein 24-stündiges Zeitfenster zur Glukosebehandlung angewendet wurde. Dennoch lässt sich argumentieren, dass sich Effekte auf die Transkription erst nach einiger Zeit aufgrund des Zwischenschritts der Translation und des Transports zum Wirkungsort in der Zelle funktional bemerkbar machen können.

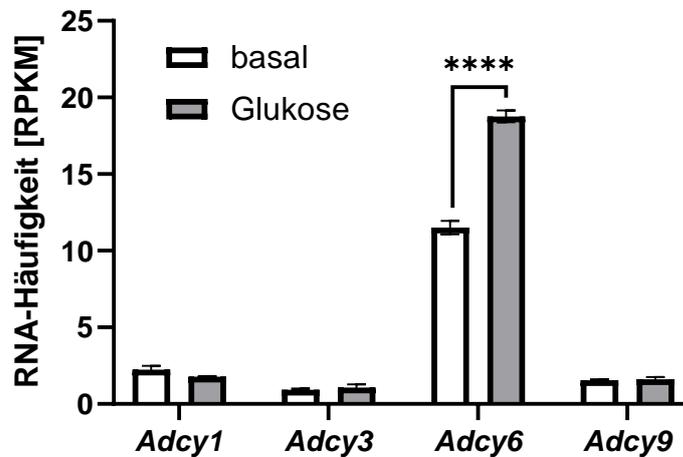


Abbildung 4.1: **Adenylatzyklasen in der RNA-Sequenzierung**

mHypoA-2/10-Zellen wurden für drei Stunden entweder in Nährmedium ohne Glukose (basal) oder einer Konzentration von 2,5 mM Glukose (Glukose) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Dargestellt sind die RPKM-Werte (Reads per kilobase of transcript per Million mapped reads) für alle exprimierten (RPKM  $\geq 1$ ) Adenylatzyklasen (*Adcy*). Einzig signifikant verändert war *Adcy6* mit einem FDR-korrigierten (False Discovery Rate) p-Wert  $< 0,0001$ ,  $n = 3$ .

## 4.7 Mechanismen der Glukose-induzierten Genexpression

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Glukose diverse Gene in der hypothalamischen Zelllinie, mHypoA-2/10, induziert, stellt sich nun natürlich die Frage, über welche Mechanismen die Glukosekonzentration im Medium Einfluss auf die Genexpression nimmt. Ein bereits einleitend besprochener Mechanismus ist die Aktivierung von Promotoren mittels Transkriptionsfaktoren, auf die im Folgenden nun näher eingegangen werden soll. Lerner *et al.* (2009) hatten eine Glukose-abhängige Transkription von *IRS2* über Aktivierung von *CRTC2* in hypothalamischen Neuronen beschrieben. Breit *et al.* (2016) konnten dies für die ebenfalls hypothalamischen mHypoA-2/10-Zellen bestätigen, indem sie zeigten, dass Glukose über eine Inaktivierung der AMPK und damit einhergehender verminderter Phosphorylierung, d.h. Aktivierung, von *CRTC2* zu dessen Translokation in den Nukleus und folglich zu einer vermehrten Transkription des vom CRE-Promotor-abhängigen Reportergens kam. Diese Erkenntnisse bildeten dann die Grundlage für die Experimente der vorliegenden Arbeit. Von den hierbei identifizierten 13 hochsignifikant durch Glukose induzierten Genen wiesen, gemäß der von Zhang *et al.* (2005) veröffentlichten Datenbank (<http://signal.salk.edu/creb/index.html>) *Irs1* und *Insig1* ein CRE in ihrer Promotorregion auf. Die Induktion dieser Gene durch Glukose ließe sich also durch eine CREB- und CRTC-vermittelte Aktivierung der Transkription erklären.

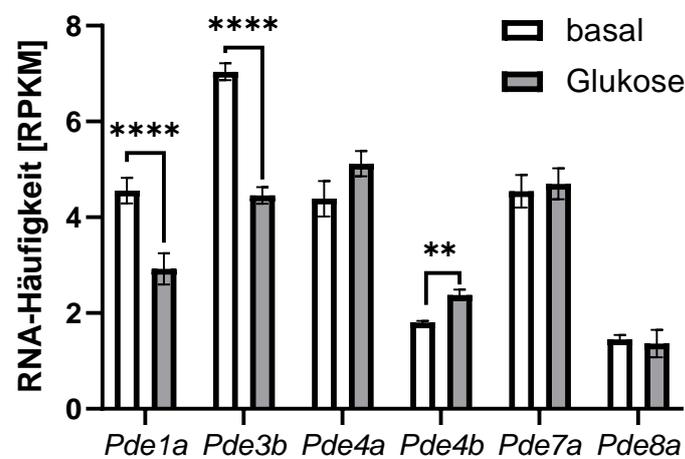


Abbildung 4.2: **Phosphodiesterasen in der RNA-Sequenzierung**

mHypoA-2/10-Zellen wurden für drei Stunden entweder in Nährmedium ohne Glukose (basal) oder einer Konzentration von 2,5 mM Glukose (Glukose) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Dargestellt sind die RPKM-Werte (Reads per kilobase of transcript per Million mapped reads) für alle exprimierten ( $\text{RPKM} \geq 1$ ) Phosphodiesterasen (Pde). Signifikant verändert waren *Pde1a* (FDR-korrigierter p-Wert  $< 0,0001$ ), *Pde3b* (FDR-korrigierter p-Wert  $< 0,0001$ ) und *Pde4b* (FDR-korrigierter p-Wert = 0,0033),  $n = 3$ .

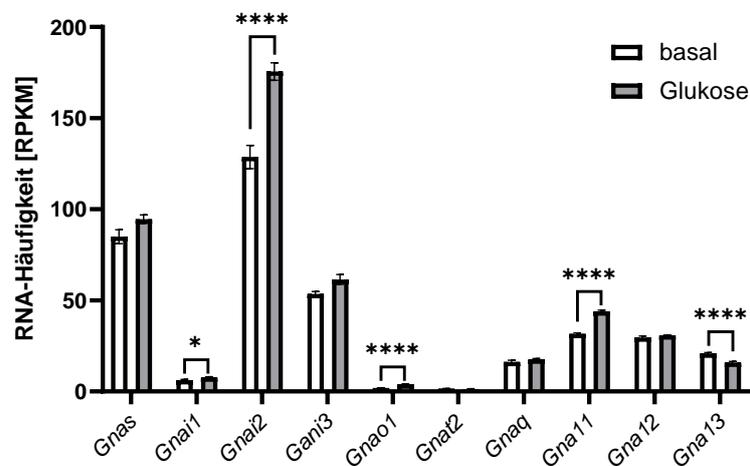


Abbildung 4.3: **Heterotrimere G-Proteine in der RNA-Sequenzierung**

mHypoA-2/10-Zellen wurden für drei Stunden entweder in Nährmedium ohne Glukose (basal) oder einer Konzentration von 2,5 mM Glukose (Glukose) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Dargestellt sind die RPKM-Werte (Reads per kilobase of transcript per Million mapped reads) für alle exprimierten ( $\text{RPKM} \geq 1$ ) G-Proteine. Signifikant verändert waren (jeweils mit FDR-korrigiertem p-Wert): *Gnai1* ( $p = 0,0259$ ), *Gnai2* ( $p < 0,0001$ ), *Gnao1* ( $p < 0,0001$ ), *Gna11* ( $p < 0,0001$ ) und *Gna13* ( $p < 0,0001$ ),  $n = 3$ .

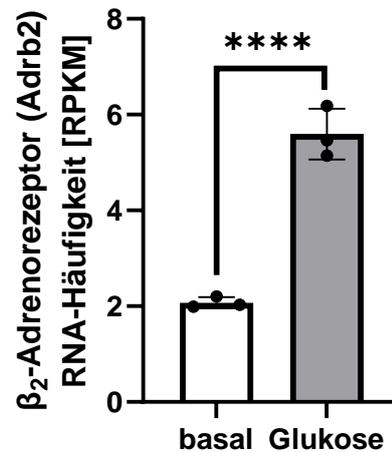


Abbildung 4.4:  $\beta_2$ -Adrenorezeptor (Adrb2) in der RNA-Sequenzierung

mHypoA-2/10-Zellen wurden für drei Stunden entweder in Nährmedium ohne Glukose (basal) oder einer Konzentration von 2,5 mM Glukose (Glukose) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Dargestellt sind die RPKM-Werte (Reads per kilobase of transcript per Million mapped reads) für den einzigen exprimierten Adrenorezeptor ( $\beta_2$ , Adrb2). Induktion um 170%, FDR-korrigierter p-Wert < 0,0001, n = 3.

CRE ist jedoch nicht die einzige Promotorsequenz welche von Glukose-abhängigen Transkriptionsfaktoren gebunden wird. Glukose-induzierte Genexpression wurde in der Vergangenheit besonders für Leberzellen, Fettgewebe und  $\beta$ -Zellen nachgewiesen. In diesem Zusammenhang wurde eine Promotorregion identifiziert, die gemeinhin als Carbohydrate Response Element (ChoRE) bekannt ist. Als mögliche Liganden für dieses Promotor-Element kommt eine ganze Reihe von Transkriptionsfaktoren in Frage, die wiederum durch Glukose in ihrer Aktivität beeinflusst werden und so den Glukose-Effekt auf die Genexpression vermitteln sollen.

Als wichtigster Transkriptionsfaktor und Ligand des *ChoRE* gilt *ChREBP* (Yamashita *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2006). Die Wirkungsweise von *ChREBP* wird folgendermaßen erklärt: Glukose wird nach Aufnahme in die Zelle zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert und danach u.a. in den Pentosephosphatweg eingeschleust. Im Rahmen des Pentosephosphatweges entsteht Xylolose-5-Phosphat, was wiederum die Phosphoproteinphosphatase 2A (PP2A) aktiviert. Die PP2A dephosphoryliert dann ihrerseits das im Zytosol befindliche Phospho-ChREBP, sodass dieses in den Zellkern wandern kann und dort zusammen mit dem MAX-like protein X (Mlx) den ChoRE-Promotor bindet. Wegen dieser Interaktion mit Mlx wird das *ChREBP* auch *Mlxipl* (*MLX interacting protein-like*) genannt. *ChREBP* (*Mlxipl*) selbst war in der RNA-Sequenzierung nicht exprimiert. Dies steht in Übereinstimmung mit der Literatur, wonach *ChREBP* (*Mlxipl*) im Gehirn kaum exprimiert ist (Ortega-Prieto & Postic, 2019). Es existiert allerdings ein ubiquitär exprimiertes Homolog, *MondoA* oder *Mlxip* genannt. Tatsächlich waren sowohl *Mlxip* als auch *Mlx* laut der im

Rahmen dieser Arbeit durchgeführten RNA-Sequenzierung in den mHypoA-2/10-Zellen exprimiert. *Mlxip* war zwar um etwa zwei Drittel schwächer als *Mlx* exprimiert, zeigte sich aber in seiner Expression durch die Glukosebehandlung verringert (Abbildung 4.5).

Das Vorhandensein des *ChREBP*-Homologs *Mlxip* sowie dessen Dimerisationspartners *Mlx* legt nahe, dass Glukose vermittelte Genexpression über diesen bedeutsamen Mechanismus, der in anderen Geweben bereits beschrieben wurde, auch in den hypothalamischen mHypoA-2/10-Zellen reguliert wird. Interessant ist auch die beobachtete Verringerung der Expression von *Mlxip* durch Glukose, die auf eine Art Feedback-Loop hinweisen könnte, der durch eine Drosselung von *Mlxip* eine überschießende Glukose-induzierte Genexpression verhindert.

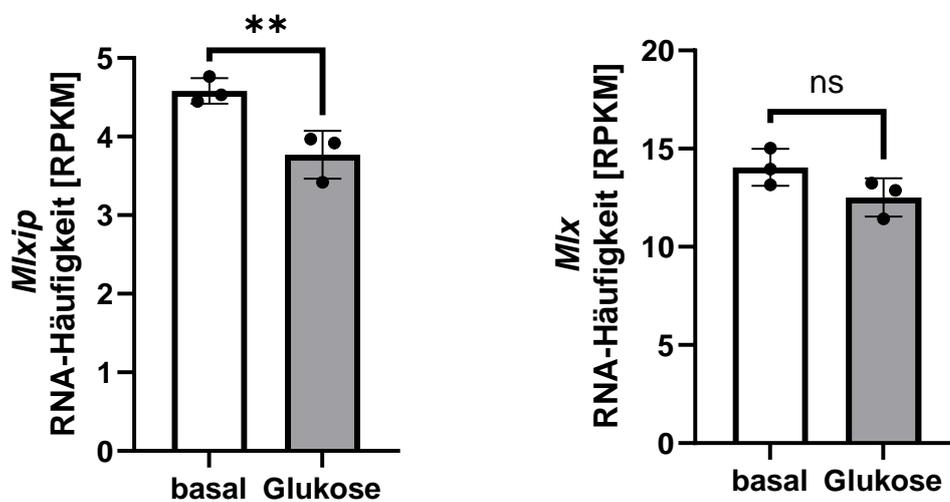


Abbildung 4.5: *Mlxip* und *Mlx* in der RNA-Sequenzierung

mHypoA-2/10-Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation bei 0,1 mM Glukose für weitere drei Stunden entweder bei 2,5 mM Glukose oder in Medium ohne Glukose (basal) inkubiert. Darstellung der Expressionswerte von *Mlxip* (*MLX interacting protein*) und *Mlx* (*MAX-like protein X*) in RPKM (Reads per kilobase of transcript per Million mapped reads) in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration (basal = 0,0 mM und Glc = 2,5 mM). FDR-korrigierte p-Werte = 0,001 (*Mlxip*) und 0,06 (*Mlx*), n = 3.

## 4.8 Limitationen und weiterführende Forschungen

Eine Limitation der vorliegenden Arbeit stellen die verwendeten Glukosekonzentrationen dar, die im Spannungsverhältnis zwischen den Bedingungen *in vivo* und denen in der Kulturflasche stehen. Es wurden bewusst Konzentrationen gewählt, die dem Maximum und Minimum im zerebralen Interstitium gesunder Mäuse entsprechen, wohlweillich, dass die

immortalisierten Zellklone in der Kulturflasche normalerweise bei 25 mM Glukose kultiviert werden. Inwiefern die niedrigen Glukosekonzentrationen möglicherweise einen außergewöhnlichen Stress für die Zellen darstellen könnten – der etwa zu vermehrtem Zelltod führen würde – wurde mittels optischer Bewertung der Zellphysiognomie im Rahmen der routinemäßigen Lichtmikroskopie untersucht. Hierbei zeigte sich vom optischen Eindruck her kein Unterschied zwischen den Versuchsbedingungen, was Zellform, Adhärenz und Konfluenz anging. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, in weiterführenden Arbeiten die Anzahl der Apoptosen und den oxidativen Stress unter den verwendeten Versuchsbedingungen zu quantifizieren, um den Einfluss der Glukosekonzentration auf das “Wohlbe finden” der Zellen zu objektivieren.

In der RNA-Sequenzierung war unter anderem das Gen *Hmox1* (Hämoxigenase 1) als durch Glukose beeinflusst identifiziert worden. *Hmox1* war mit Werten um die 320 RPKM unter basalen Bedingungen vergleichsweise stark exprimiert gewesen. Seine Expression unter Glukose-Bedingungen war dagegen mit Werten unter 100 RPKM deutlich verringert. HMOX1 gehört zu den Hitzeschockproteinen (heat shock proteins, HSP). Seine vermehrte Expression unter basalen Bedingungen deutet auf eine Stresssituation der Zelle hin. HMOX1 spielt aber nicht nur bei oxidativem Stress eine Rolle, sondern ist auch im Hinblick auf den Diabetes mellitus sowie das Metabolische Syndrom interessant. Jais *et al.* (2014) konnten zeigen, dass HMOX1 als diagnostischer Prädiktor für das Metabolische Syndrom herangezogen werden kann. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Beeinflussbarkeit der Expression von *Hmox1* durch Glukose ist in diesem Zusammenhang sehr interessant, da somit auch ein langfristiger Einfluss der Glukose unter pathologischen Bedingungen eine veränderte HMOX1-Expression nahelegt.

Bei allen Schlussfolgerungen ist natürlich zu beachten, dass die Erkenntnisse an Zelllinien gewonnen wurden, die aufgrund ihres Wesens als immortalisierte Klone zwar zelluläre Mechanismen abbilden können, jedoch Rückschlüsse auf Gewebe oder gar den ganzen Organismus nur bedingt zulassen. Nichtsdestotrotz lassen die Ergebnisse aufschlussreiche Einsichten in die durch Glukose beeinflussten Vorgänge auf Zellebene zu und ermöglichen es dadurch Hypothesen für höhere Ebenen, wie Geweben oder dem Organismus, aufzustellen. Dadurch fungieren sie als eine wertvolle Grundlage für weiterführende Untersuchungen.

Für weiterführende Forschungen empfiehlt sich eine Validierung der Daten *in vivo*, z.B. in einem Mausmodell. Denkbar wäre die Untersuchung von Unterschieden in der Genexpression von normalgewichtigen und übergewichtigen Mäusen oder speziell gefütterter Mäuse in Abhängigkeit von deren Blutglukosekonzentrationen. Eine Herausforderung dürfte hierbei die Reproduzierbarkeit der in der vorliegenden Arbeit simulierten interstitiellen Glukosekonzentration sein. In einem Zwischenschritt wäre auch die Untersuchung der Genexpression in Gehirn-Organoiden *in vitro* unter variierenden Glukosekonzentrationen interessant zu untersuchen. Die Kontrolle der Glukosekonzentration wäre hierbei auch einfacher als *in vivo*.

## 4.9 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass Glukose in Abhängigkeit von seiner Konzentration die Genexpression in hypothalamischen Zellen der Zelllinie mHypoA-2/10 differenziert organisiert. Während einzelne Gene mit einer Steigerung ihrer Expression auf die veränderten Kulturbedingungen reagierten, wurden andere wiederum inhibiert, während der Großteil der Gene sich von der Glukosekonzentration unbeeinflusst zeigte. Wesentliche Biosynthese- und Signalwege wie die Cholesterin-Biosynthese, die ungefaltete Protein-Antwort und die Gruppe der Phospholipasen zeigten sich entweder stark durch Glukose induziert (Cholesterin-Biosynthese, Phospholipasen) oder reduziert (ungefaltete Protein-Antwort). Zentrale Beobachtungen der RNA-Sequenzierung konnten mit dem RT-qPCR-Verfahren validiert werden. Die zellphysiologische Relevanz der beobachteten Veränderungen der RNA in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration zeigte sich in korrespondierenden Veränderungen auf Protein-Ebene (IRS1, INSIG1). Mögliche Erklärungsansätze zum zugrundeliegenden Mechanismus zeigten Glukose-abhängige Phosphorylierungen wichtiger Proteine, die Einfluss auf die Genexpression nehmen (ERK, CREB). Zuletzt konnte auch noch ein Einfluss von Glukose auf die intrazelluläre Katecholaminantwort in Form einer Glukose-modulierten cAMP-Akkumulation nach Noradrenalin-Stimulation nachgewiesen werden. Glukose kann somit als facettenreicher Modulator der zellulären Genexpression und Signalverarbeitung angesehen werden. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass Glukose-induzierte Veränderungen der hypothalamischen Genexpression ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von Stoffwechselerkrankungen wie dem Diabetes mellitus oder dem metabolischem Syndrom sind und möglicherweise neue Ansätze zur Prävention und Therapie dieser Erkrankungen liefern werden.



# Literaturverzeichnis

- Aizawa, Megumi, & Fukuda, Mitsunori. 2015. Small GTPase Rab2B and Its Specific Binding Protein Golgi-associated Rab2B Interactor-like 4 (GARI-L4) Regulate Golgi Morphology\*. *Journal of Biological Chemistry*, **290**(36), 22250–22261.
- Alberti, George, Zimmet, Paul, Shaw, Jonathan, & Grundy, Scott. 2006. *The IDF consensus worldwide definition of the METABOLIC SYNDROME*. Report.
- Alonge, K. M., D'Alessio, D. A., & Schwartz, M. W. 2021. Brain control of blood glucose levels: implications for the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetologia*, **64**(1), 5–14.
- Altarejos, J. Y., & Montminy, M. 2011. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**(3), 141–51.
- Amillet, Jean-Michel, Ferbus, Didier, Real, Francisco X., Antony, Claude, Muleris, Martine, Gress, Thomas M., & Goubin, Gérard. 2006. Characterization of human Rab20 overexpressed in exocrine pancreatic carcinoma. *Human Pathology*, **37**(3), 256–263.
- Anderson, K. A., Green, M. F., Huynh, F. K., Wagner, G. R., & Hirschey, M. D. 2014. SnapShot: Mammalian Sirtuins. *Cell*, **159**(4), 956–956.e1.
- Ashcroft, F. M., & Rorsman, P. 2012. Diabetes Mellitus and the beta Cell: The Last Ten Years. *Cell*, **148**(6), 1160–1171.
- Audas, T. E., Li, Y., Liang, G., & Lu, R. 2008. A novel protein, Luman/CREB3 recruitment factor, inhibits Luman activation of the unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, **28**(12), 3952–66.
- Banerjee, Upasana, & Cheng, Xiaodong. 2015. Exchange protein directly activated by cAMP encoded by the mammalian rapgef3 gene: Structure, function and therapeutics. *Gene*, **570**(2), 157–167.
- Baumgartner-Parzer, Sabina. 2018. Monogene Adipositas (Melanocortin-4-Rezeptor-Mangel). *Journal für Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel*, **11**(3), 101–103.
- Belsham, D. D., Fick, L. J., Dalvi, P. S., Centeno, M. L., Chalmers, J. A., Lee, P. K., Wang, Y., Drucker, D. J., & Koletar, M. M. 2009. Ciliary neurotrophic factor recruitment of

- glucagon-like peptide-1 mediates neurogenesis, allowing immortalization of adult murine hypothalamic neurons. *Faseb j*, **23**(12), 4256–65.
- Benchoula, Khaled, Parhar, Ishwar S., Madhavan, Priya, & Hwa, Wong Eng. 2021. CREB nuclear transcription activity as a targeting factor in the treatment of diabetes and diabetes complications. *Biochemical Pharmacology*, **188**, 114531.
- Bernards, André. 2003. GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, **1603**(2), 47–82.
- Bilasy, Shymaa E., Satoh, Takaya, Terashima, Toshio, & Kataoka, Tooru. 2011. RA-GEF-1 (Rapgef2) is essential for proper development of the midline commissures. *Neuroscience Research*, **71**(3), 200–209.
- Boulton, Teri G., Nye, Steven H., Robbins, David J., Ip, Nancy Y., Radzlejewska, Elizabeth, Morgenbesser, Sharon D., DePinho, Ronald A., Panayotatos, Nikos, Cobb, Melanie H., & Yancopoulos, George D. 1991. ERKs: A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, **65**(4), 663–675.
- Breit, A., Wicht, K., Boekhoff, I., Glas, E., Lauffer, L., Muckter, H., & Gudermann, T. 2016. Glucose Enhances Basal or Melanocortin-Induced cAMP-Response Element Activity in Hypothalamic Cells. *Mol Endocrinol*, **30**(7), 748–62.
- Bros, Matthias, Haas, Katharina, Moll, Lorna, & Grabbe, Stephan. 2019. RhoA as a Key Regulator of Innate and Adaptive Immunity. *Cells*, **8**(7), 733.
- Bucci, Cecilia, Parton, Robert G., Mather, Ian H., Stunnenberg, Henk, Simons, Kai, Hoflack, Bernard, & Zerial, Marino. 1992. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*, **70**(5), 715–728.
- Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). 2023. *Nationale VersorgungsLeitlinie Typ-2-Diabetes – Langfassung. Version 3.0*.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, **55**(4), 611–22.
- Canovas Nunes, Sara, Manzoni, Martina, Pizzi, Marco, Mandato, Elisa, Carrino, Marilena, Quotti Tubi, Laura, Zambello, Renato, Adami, Fausto, Visentin, Andrea, Barilà, Gregorio, Trentin, Livio, Manni, Sabrina, Neri, Antonino, Semenzato, Gianpietro, & Piazza, Francesco. 2018. The small GTPase RhoU lays downstream of JAK/STAT signaling and mediates cell migration in multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*, **8**(2), 20.

- Chang, Tien-Jyun, Tsai, Ming-Han, Jiang, Yi-Der, Lee, Borheng, Lee, Kuan-Ching, Lin, Jin-Yu, Chiu, Ken C., Tai, Tong-Yuan, & Chuang, Lee-Ming. 2002. The Arg16Gly polymorphism of human beta2-adrenoreceptor is associated with type 2 diabetes in Taiwanese people. *Clinical Endocrinology*, **57**(5), 685–690.
- Chen, Sing-Young, Olzomer, Ellen M., Beretta, Martina, Cantley, James, Nunemaker, Craig S., Hoehn, Kyle L., & Byrne, Frances L. 2022. Investigating the Expression and Function of the Glucose Transporter GLUT6 in Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**(17), 9798.
- Cheung, Kyle G., Cole, Laura K., Xiang, Bo, Chen, Keyun, Ma, Xiuli, Myal, Yvonne, Hatch, Grant M., Tong, Qiang, & Dolinsky, Vernon W. 2015. Sirtuin-3 (SIRT3) Protein Attenuates Doxorubicin-induced Oxidative Stress and Improves Mitochondrial Respiration in H9c2 Cardiomyocytes\*. *Journal of Biological Chemistry*, **290**(17), 10981–10993.
- Chiba, Takuto, Peasley, Kevin D., Cargill, Kasey R., Maringer, Katherine V., Bharathi, Sivakama S., Mukherjee, Elina, Zhang, Yuxun, Holtz, Anja, Basisty, Nathan, Yagobian, Shiva D., Schilling, Birgit, Goetzman, Eric S., & Sims-Lucas, Sunder. 2019. Sirtuin 5 Regulates Proximal Tubule Fatty Acid Oxidation to Protect against AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*, **30**(12).
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**(1), 156–9.
- Chomczynski, Piotr, & Sacchi, Nicoletta. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, **1**(2), 581–585.
- Clemmons, David R., Maile, Laura A., Ling, Yan, Yarber, J., & Busby, Walker H. 2007. Role of the integrin  $\alpha V\beta 3$  in mediating increased smooth muscle cell responsiveness to IGF-I in response to hyperglycemic stress. *Growth Hormone & IGF Research*, **17**(4), 265–270.
- Cooke, Mariana, Kreider-Letterman, Gabriel, Baker, Martin J., Zhang, Suli, Sullivan, Neil T., Eruslanov, Evgeniy, Abba, Martin C., Goicoechea, Silvia M., García-Mata, Rafael, & Kazanietz, Marcelo G. 2021. FARP1, ARHGEF39, and TIAM2 are essential receptor tyrosine kinase effectors for Rac1-dependent cell motility in human lung adenocarcinoma. *Cell Reports*, **37**(5), 109905.
- Couturier, C., Sarkis, C., Séron, K., Belouzard, S., Chen, P., Lenain, A., Corset, L., Dam, J., Vauthier, V., Dubart, A., Mallet, J., Froguel, P., Rouillé, Y., & Jockers, R. 2007. Silencing of OB-RGRP in mouse hypothalamic arcuate nucleus increases leptin receptor signaling and prevents diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(49), 19476–81.

- Dalle Grave, R., Calugi, S., Molinari, E., Petroni, M. L., Bondi, M., Compare, A., & Marchesini, G. 2005. Weight loss expectations in obese patients and treatment attrition: an observational multicenter study. *Obes Res*, **13**(11), 1961–9. Dalle Grave, Riccardo Calugi, Simona Molinari, Enrico Petroni, Maria Letizia Bondi, Mario Compare, Angelo Marchesini, Giulio QUOVADIS Study Group Journal Article Multicenter Study Research Support, Non-U.S. Gov't United States 2005/12/13 *Obes Res*. 2005 Nov;13(11):1961-9. doi: 10.1038/oby.2005.241.
- Daly, M. E., Vale, C., Walker, M., Littlefield, A., Alberti, Kgmm, & Mathers, J. C. 1998. Acute effects on insulin sensitivity and diurnal metabolic profiles of a high-sucrose compared with a high-starch diet. *American Journal of Clinical Nutrition*, **67**(6), 1186–1196.
- Davis, S., Vanhoutte, P., Pages, C., Caboche, J., & Laroche, S. 2000. The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and cAMP response element-binding protein to control long-term potentiation-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci*, **20**(12), 4563–72.
- Debaugnies, Maud, Rodríguez-Acebes, Sara, Blondeau, Jeremy, Parent, Marie-Astrid, Zocco, Manuel, Song, Yura, de Maertelaer, Viviane, Moers, Virginie, Latil, Mathilde, Dubois, Christine, Coulonval, Katia, Impens, Francis, Van Haver, Delphi, Dufour, Sara, Uemura, Akiyoshi, Sotiropoulou, Panagiota A., Méndez, Juan, & Blanpain, Cédric. 2023. RHOJ controls EMT-associated resistance to chemotherapy. *Nature*, **616**(7955), 168–175.
- Deem, Jennifer D., Muta, Kenjiro, Scarlett, Jarrad M., Morton, Gregory J., & Schwartz, Michael W. 2017. How Should We Think About the Role of the Brain in Glucose Homeostasis and Diabetes? *Diabetes*, **66**(7), 1758–1765.
- Delacrétaz, Aurélie, Zdravovic, Adna, Vandenberghe, Frederik, Saigi-Morgui, Nuria, Glatard, Anaïs, Quteineh, Lina, Gholam-Rezaee, Mehdi, Raffoul, Wassim, Applegate, Lee Ann, Jafari, Paris, Gamma, Franziska, von Gunten, Armin, Conus, Philippe, & Eap, Chin B. 2017. Association of variants in SH2B1 and RABEP1 with worsening of low-density lipoprotein and glucose parameters in patients treated with psychotropic drugs. *Gene*, **628**, 8–15.
- Deutsche Adipositas-Gesellschaft. 2014. *S3-Leitlinie Adipositas - Prävention und Therapie. Version 4.2.*
- Dibble, Christian C, Elis, Winfried, Menon, Suchithra, Qin, Wei, Klekota, Justin, Asara, John M, Finan, Peter M, Kwiatkowski, David J, Murphy, Leon O, & Manning, Brendan D. 2012. TBC1D7 Is a Third Subunit of the TSC1-TSC2 Complex Upstream of mTORC1. *Molecular Cell*, **47**(4), 535–546.
- Dietschy, John M., & Turley, Stephen D. 2001. Cholesterol metabolism in the brain. *Current Opinion in Lipidology*, **12**(2), 105–112.

- Dioum, Elhadji M., Chen, Rui, Alexander, Matthew S., Zhang, Quiyang, Hogg, Richard T., Gerard, Robert D., & Garcia, Joseph A. 2009. Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 2 $\alpha$  Signaling by the Stress-Responsive Deacetylase Sirtuin 1. *Science*, **324**(5932), 1289–1293.
- Dunford, A. R., & Sangster, J. M. 2017. Maternal and paternal periconceptual nutrition as an indicator of offspring metabolic syndrome risk in later life through epigenetic imprinting: A systematic review. *Diabetes Metab Syndr*, **11 Suppl 2**, S655–s662. 1878-0334 Dunford, Ashley R Sangster, Janice M Journal Article Review Systematic Review Netherlands 2017/05/24 Diabetes Metab Syndr. 2017 Dec;11 Suppl 2:S655-S662. doi: 10.1016/j.dsx.2017.04.021. Epub 2017 May 10.
- Emery, Andrew C., Eiden, Maribeth V., Mustafa, Tomris, & Eiden, Lee E. 2013. Rapgef2 Connects GPCR-Mediated cAMP Signals to ERK Activation in Neuronal and Endocrine Cells. *Science Signaling*, **6**(281), ra51–ra51.
- Feng, Huijie, Khalil, Suad, Neubig, Richard R., & Sidiropoulos, Christos. 2018. A mechanistic review on GNAO1-associated movement disorder. *Neurobiology of Disease*, **116**, 131–141.
- Field, A. E., Willett, W. C., Lissner, L., & Colditz, G. A. 2007. Dietary fat and weight gain among women in the Nurses' Health Study. *Obesity (Silver Spring)*, **15**(4), 967–76.
- Finelli, Mattéa J, Aprile, Davide, Castroflorio, Enrico, Jeans, Alexander, Moschetta, Matteo, Chessum, Lauren, Degiacomi, Matteo T, Grasegger, Julia, Lupien-Meilleur, Alexis, Bassett, Andrew, Rossignol, Elsa, Campeau, Philippe M, Bowl, Michael R, Benfenati, Fabio, Fassio, Anna, & Oliver, Peter L. 2018. The epilepsy-associated protein TBC1D24 is required for normal development, survival and vesicle trafficking in mammalian neurons. *Human Molecular Genetics*, **28**(4), 584–597.
- Fuchsberger, Christian, Flannick, Jason, Teslovich, Tanya M., Mahajan, Anubha, Agrawala, Vineeta, Gaulton, Kyle J., Ma, Clement, Fontanillas, Pierre, Moutsianas, Loukas, McCarthy, Davis J., Rivas, Manuel A., Perry, John R. B., Sim, Xueling, Blackwell, Thomas W., Robertson, Neil R., Rayner, N. William, Cingolani, Pablo, Locke, Adam E., Tajes, Juan Fernandez, Highland, Heather M., Dupuis, Josee, Chines, Peter S., Lindgren, Cecilia M., Hartl, Christopher, Jackson, Anne U., Chen, Han, Huyghe, Jeroen R., van de Bunt, Martijn, Pearson, Richard D., Kumar, Ashish, Müller-Nurasyid, Martina, Grarup, Niels, Stringham, Heather M., Gamazon, Eric R., Lee, Jaehoon, Chen, Yuhui, Scott, Robert A., Below, Jennifer E., Chen, Peng, Huang, Jinyan, Go, Min Jin, Stitzel, Michael L., Pasko, Dorota, Parker, Stephen C. J., Varga, Tibor V., Green, Todd, Beer, Nicola L., Day-Williams, Aaron G., Ferreira, Teresa, Fingerlin, Tasha, Horikoshi, Momoko, Hu, Cheng, Huh, Iksoo, Ikram, Mohammad Kamran, Kim, Bong-Jo, Kim, Yongkang, Kim, Young Jin, Kwon, Min-Seok, Lee, Juyoung, Lee, Selyeong, Lin, Keng-Han, Maxwell, Taylor J., Nagai, Yoshihiko, Wang, Xu, Welch, Ryan P., Yoon, Joon, Zhang, Weihua, Barzilai, Nir, Voight, Benjamin F., Han, Bok-Ghee, Jenkinson, Christopher P.,

- Kuulasmaa, Teemu, Kuusisto, Johanna, Manning, Alisa, Ng, Maggie C. Y., Palmer, Nicholette D., Balkau, Beverley, Stančáková, Alena, Abboud, Hanna E., Boeing, Heiner, Giedraitis, Vilmantas, Prabhakaran, Dorairaj, Gottesman, Omri, Scott, James, Carey, Jason, Kwan, Phoenix, Grant, George, Smith, Joshua D., Neale, Benjamin M., Purcell, Shaun, Butterworth, Adam S., Howson, Joanna M. M., Lee, Heung Man, Lu, Yingchang, Kwak, Soo-Heon, Zhao, Wei, Danesh, John, Lam, Vincent K. L., Park, Kyong Soo, Saleheen, Danish, *et al.* . 2016. The genetic architecture of type 2 diabetes. *Nature*, **536**(7614), 41–47.
- Giannandrea, Maila, Bianchi, Veronica, Mignogna, Maria Lidia, Sirri, Alessandra, Carrabino, Salvatore, D’Elia, Errico, Vecellio, Matteo, Russo, Silvia, Cogliati, Francesca, Larizza, Lidia, Ropers, Hans-Hilger, Tzschach, Andreas, Kalscheuer, Vera, Oehl-Jaschkowitz, Barbara, Skinner, Cindy, Schwartz, Charles E., Gecz, Jozef, Van Esch, Hilde, Raynaud, Martine, Chelly, Jamel, de Brouwer, Arjan P. M., Toniolo, Daniela, & D’Adamo, Patrizia. 2010. Mutations in the Small GTPase Gene RAB39B Are Responsible for X-linked Mental Retardation Associated with Autism, Epilepsy, and Macrocephaly. *The American Journal of Human Genetics*, **86**(2), 185–195.
- Giovannucci, Edward, Harlan, David M., Archer, Michael C., Bergenstal, Richard M., Gapstur, Susan M., Habel, Laurel A., Pollak, Michael, Regensteiner, Judith G., & Yee, Douglas. 2010. Diabetes and Cancer: A consensus report. *Diabetes Care*, **33**(7), 1674–1685.
- Gloerich, Martijn, ten Klooster, Jean Paul, Vliem, Marjolein J., Koorman, Thijs, Zwartkruis, Fried J., Clevers, Hans, & Bos, Johannes L. 2012. Rap2A links intestinal cell polarity to brush border formation. *Nature Cell Biology*, **14**(8), 793–801.
- Gomes, Pedro, Fleming Outeiro, Tiago, & Cavadas, Cláudia. 2015. Emerging Role of Sirtuin 2 in the Regulation of Mammalian Metabolism. *Trends in Pharmacological Sciences*, **36**(11), 756–768.
- Gong, Yi, Lee, Joon No, Lee, Peter C. W., Goldstein, Joseph L., Brown, Michael S., & Ye, Jin. 2006. Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake. *Cell Metabolism*, **3**(1), 15–24. doi: 10.1016/j.cmet.2005.11.014.
- Gorvin, Caroline M, Cranston, Treena, Hannan, Fadil M, Rust, Nigel, Qureshi, Asjid, Nesbit, M Andrew, & Thakker, Rajesh V. 2016. A G-protein Subunit- $\alpha$ 11 Loss-of-Function Mutation, Thr54Met, Causes Familial Hypocalciuric Hypercalcemia Type 2 (FHH2). *Journal of Bone and Mineral Research*, **31**(6), 1200–1206.
- Gotoh, Takaya, Hattori, Seisuke, Nakamura, Shun, Kitayama, Hitoshi, Noda, Makoto, Takai, Yoshimi, Kaibuchi, Kozo, Matsui, Hideki, Hatase, Osamu, Takahashi, Hidehiro, Kurata, Takeshi, & Matsuda, Michiyuki. 1995. Identification of Rap1 as a Target for

- the Crk SH3 Domain-Binding Guanine Nucleotide-Releasing Factor C3G. *Molecular and Cellular Biology*, **15**(12), 6746–6753. doi: 10.1128/MCB.15.12.6746.
- Goueli, Basem S., Powell, Marianne Broome, Finger, Elizabeth C., & Pfeffer, Suzanne R. 2012. TBC1D16 is a Rab4A GTPase activating protein that regulates receptor recycling and EGF receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**(39), 15787–15792.
- Grarup, Niels, Moltke, Ida, Andersen, Mette K., Dalby, Maria, Vitting-Seerup, Kristoffer, Kern, Timo, Mahendran, Yuvaraj, Jørsboe, Emil, Larsen, Christina V. L., Dahl-Petersen, Inger K., Gilly, Arthur, Suveges, Daniel, Dedoussis, George, Zeggini, Eleftheria, Pedersen, Oluf, Andersson, Robin, Bjerregaard, Peter, Jørgensen, Marit E., Albrechtsen, Anders, & Hansen, Torben. 2018. Loss-of-function variants in ADCY3 increase risk of obesity and type 2 diabetes. *Nature Genetics*, **50**(2), 172–174.
- Greninger, Alexander L., Knudsen, Giselle M., Betegon, Miguel, Burlingame, Alma L., & DeRisi, Joseph L. 2013. ACBD3 Interaction with TBC1 Domain 22 Protein Is Differentially Affected by Enteroviral and Kobuviral 3A Protein Binding. *mBio*, **4**(2), 10.1128/mbio.00098–13.
- Gros, Robert, Uum, Stan Van, Hutchinson-Jaffe, Adam, Ding, Qingming, Pickering, J. Geoffrey, Hegele, Robert A., & Feldman, Ross D. 2007. Increased Enzyme Activity and  $\beta$ -Adrenergic-Mediated Vasodilation in Subjects Expressing a Single-Nucleotide Variant of Human Adenylyl Cyclase 6. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **27**(12), 2657–2663.
- Gruetter, R., Novotny, E. J., Boulware, S. D., Rothman, D. L., Mason, G. F., Shulman, G. I., Shulman, R. G., & Tamborlane, W. V. 1992. Direct measurement of brain glucose concentrations in humans by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(3), 1109–12.
- Guedouari, Hala, Daigle, Tanya, Scorrano, Luca, & Hebert-Chatelain, Etienne. 2017. Sir-tuin 5 protects mitochondria from fragmentation and degradation during starvation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1864**(1), 169–176.
- Guo, Paipai, Tai, Yu, Wang, Manman, Sun, Hanfei, Zhang, Lingling, Wei, Wei, Xiang, Yang K., & Wang, Qingtong. 2022.  $G\alpha 12$  and  $G\alpha 13$ : Versatility in Physiology and Pathology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **10**.
- Hauser, Karin. 2022. *Glucosetransporter*. 5. vollständig überarbeitete auflage edn. Georg Thieme Verlag KG.
- Hermouet, Sylvie, de Mazancourt, Philippe, & Spiegel, Allen M. 1993. Mitogenic effects of pertussis toxin-sensitive G-protein  $\alpha$  subunits: The mitogenic action of  $\alpha i2$  in NIH 3T3 cells is mimicked by  $\alpha i1$ , but not  $\alpha i3$ . *Cellular Signalling*, **5**(2), 215–225.

- Hershberger, Kathleen A., Abraham, Dennis M., Martin, Angelical S., Mao, Lan, Liu, Juan, Gu, Hongbo, Locasale, Jason W., & Hirschey, Matthew D. 2017. Sirtuin 5 is required for mouse survival in response to cardiac pressure overload. *Journal of Biological Chemistry*, **292**(48), 19767–19781.
- Hironori, Nishino, Taro, Saito, Ran, Wei, Tetsuya, Takano, Koji, Tsutsumi, Makoto, Taniguchi, Kanae, Ando, Mineko, Tomomura, Mitsunori, Fukuda, & Shin-ichi, Hisanaga. 2019. The LMTK1-TBC1D9B-Rab11A Cascade Regulates Dendritic Spine Formation via Endosome Trafficking. *The Journal of Neuroscience*, **39**(48), 9491.
- Hong, Kyung-Won, Jin, Hyun-Seok, Lim, Ji-Eun, Ryu, Ha-Jung, Go, Min Jin, Lee, Jong-Young, Woo, Jeong-Taek, Park, Hun Kuk, & Oh, Bermseok. 2009. RAPGEF1 gene variants associated with type 2 diabetes in the Korean population. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **84**(2), 117–122.
- Hoornaert, Inge, Marynen, Peter, & Baens, Mathijs. 1998. CREBL2, a Novel Transcript from the Chromosome 12 Region Flanked by ETV6 and CDKN1B. *Genomics*, **51**(1), 154–157.
- Hsu, Chieh, Morohashi, Yuichi, Yoshimura, Shin-ichiro, Manrique-Hoyos, Natalia, Jung, SangYong, Lauterbach, Marcel A., Bakhti, Mostafa, Grønberg, Mads, Möbius, Wiebke, Rhee, JeongSeop, Barr, Francis A., & Simons, Mikael. 2010. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A–C. *Journal of Cell Biology*, **189**(2), 223–232.
- Hu, Qian, Bian, Qihui, Rong, Dingchao, Wang, Leiyun, Song, Jianan, Huang, Hsuan-Shun, Zeng, Jun, Mei, Jie, & Wang, Peng-Yuan. 2023. JAK/STAT pathway: Extracellular signals, diseases, immunity, and therapeutic regimens. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **11**.
- Hu, Zhimin, Han, Yamei, Liu, Yuxiao, Zhao, Zehua, Ma, Fengguang, Cui, Aoyuan, Zhang, Feifei, Liu, Zhengshuai, Xue, Yaqian, Bai, Jinyun, Wu, Haifu, Bian, Hua, Chin, Y. Eugene, Yu, Ying, Meng, Zhuoxian, Wang, Hua, Liu, Yong, Fan, Jianguo, Gao, Xin, Chen, Yan, & Li, Yu. 2020. CREBZF as a Key Regulator of STAT3 Pathway in the Control of Liver Regeneration in Mice. *Hepatology*, **71**(4).
- Huang, Jian, Parish, Roy, Mansi, Ishak, Yu, Herbert, Kennen, Estela M., Davis, Terry, & Carden, Donna. 2008. Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol in Patients with Metabolic Syndrome. *Journal of Investigative Medicine*, **56**(7), 931–936.
- Jais, A., Einwallner, E., Sharif, O., Gossens, K., Lu, T. T. H., Soyal, S. M., Medgyesi, D., Neureiter, D., Paier-Pourani, J., Dalgaard, K., Duvigneau, J. C., Lindroos-Christensen, J., Zapf, T. C., Amann, S., Saluzzo, S., Jantscher, F., Stiedl, P., Todoric, J., Martins, R., Oberkofler, H., Muller, S., Hauser-Kronberger, C., Kenner, L., Casanova, E., Sutterluty-Fall, H., Bilban, M., Miller, K., Kozlov, A. V., Krempler, F., Knapp, S., Lumeng, C. N.,

- Patsch, W., Wagner, O., Pospisilik, J. A., & Esterbauer, H. 2014. Heme Oxygenase-1 Drives Metaflammation and Insulin Resistance in Mouse and Man. *Cell*, **158**(1), 25–40.
- Jang, Mi, Park, So-Young, Kim, Yong-Woon, Jung, Seung-Pil, & Kim, Jong-Yeon. 2017. Regulating Hypothalamus Gene Expression in Food Intake: Dietary Composition or Calorie Density? *Diabetes Metab J*, **41**(2), 121–127. doi: 10.4093/dmj.2017.41.2.121.
- Johnson, R. J., Segal, M. S., Sautin, Y., Nakagawa, T., Feig, D. I., Kang, D. H., Gersch, M. S., Benner, S., & Sánchez-Lozada, L. G. 2007. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, **86**(4), 899–906.
- Johnston, J. A., Wang, L. M., Hanson, E. P., Sun, X. J., White, M. F., Oakes, S. A., Pierce, J. H., & O’Shea, J. J. 1995. Interleukins 2, 4, 7, and 15 stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrates 1 and 2 in T cells. Potential role of JAK kinases. *J Biol Chem*, **270**(48), 28527–30. Johnston, J A Wang, L M Hanson, E P Sun, X J White, M F Oakes, S A Pierce, J H O’Shea, J J Journal Article United States 1995/12/01 J Biol Chem. 1995 Dec 1;270(48):28527-30. doi: 10.1074/jbc.270.48.28527.
- Kasmapour, Bahram, Gronow, Achim, Bleck, Christopher K. E., Hong, Wanjin, & Gutierrez, Maximiliano Gabriel. 2012. Size-dependent mechanism of cargo sorting during lysosome-phagosome fusion is controlled by Rab34. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**(50), 20485–20490.
- Kawabe, Hiroshi, Neeb, Antje, Dimova, Kalina, Young, Samuel M., Takeda, Michiko, Katsurabayashi, Shutaro, Mitkovski, Miso, Malakhova, Oxana A., Zhang, Dong-Er, Umikawa, Masato, Kariya, Ken-ichi, Goebbels, Sandra, Nave, Klaus-Armin, Rosenmund, Christian, Jahn, Olaf, Rhee, JeongSeop, & Brose, Nils. 2010. Regulation of Rap2A by the Ubiquitin Ligase Nedd4-1 Controls Neurite Development. *Neuron*, **65**(3), 358–372.
- Kawamura, H., Yokote, K., Asaumi, S., Kobayashi, K., Fujimoto, M., Maezawa, Y., Saito, Y., & Mori, S. 2004. High glucose-induced upregulation of osteopontin is mediated via Rho/Rho kinase pathway in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, **24**(2), 276–281. Kawamura, H Yokote, K Asaumi, S Kobayashi, K Fujimoto, M Maezawa, Y Saito, Y Mori, S Maezawa, Yoshiro/0000-0001-5567-9901 1524-4636.
- Kawasaki, Yoshihiro, Senda, Takao, Ishidate, Takao, Koyama, Ryo, Morishita, Tsuyoshi, Iwayama, Yoriko, Higuchi, Osamu, & Akiyama, Tetsu. 2000. Asef, a Link Between the Tumor Suppressor APC and G-Protein Signaling. *Science*, **289**(5482), 1194–1197.
- Kim, Dongjoon, Lewis, Casey Stottrup, Sarthy, Vijay P., & Roy, Sayon. 2020. High-Glucose-Induced Rab20 Upregulation Disrupts Gap Junction Intercellular Communication and Promotes Apoptosis in Retinal Endothelial and Müller Cells: Implications for Diabetic Retinopathy. *Journal of Clinical Medicine*, **9**(11), 3710.

- Kim, Hyunho, Xu, Hangxue, Yao, Qin, Li, Weizhe, Huang, Qiong, Outeda, Patricia, Cebotaru, Valeriu, Chiaravalli, Marco, Boletta, Alessandra, Piontek, Klaus, Germino, Gregory G., Weinman, Edward J., Watnick, Terry, & Qian, Feng. 2014. Ciliary membrane proteins traffic through the Golgi via a Rabep1/GGA1/Arl3-dependent mechanism. *Nature Communications*, **5**(1), 5482.
- Kitaguchi, Tetsuya, Oya, Manami, Wada, Yoshiko, Tsuboi, Takashi, & Miyawaki, Atsushi. 2013. Extracellular calcium influx activates adenylate cyclase 1 and potentiates insulin secretion in MIN6 cells. *Biochemical Journal*, **450**(2), 365–373.
- Krishnan, M., Major, T. J., Topless, R. K., Dewes, O., Yu, L., Thompson, J. M. D., McCowan, L., de Zoysa, J., Stamp, L. K., Dalbeth, N., Harré Hindmarsh, J., Rapana, N., Deka, R., Eng, W. W. H., Weeks, D. E., Minster, R. L., McGarvey, S. T., Viali, S., Naseri, T., Sefuiva Reupena, M., Wilcox, P., Grattan, D., Shepherd, P. R., Shelling, A. N., Murphy, R., & Merriman, T. R. 2018. Discordant association of the CREBRF rs373863828 A allele with increased BMI and protection from type 2 diabetes in Māori and Pacific (Polynesian) people living in Aotearoa/New Zealand. *Diabetologia*, **61**(7), 1603–1613.
- Latinkić, B. V., Zeremski, M., & Lau, L. F. 1996. Elk-1 can recruit SRF to form a ternary complex upon the serum response element. *Nucleic Acids Res*, **24**(7), 1345–51. 1362-4962 Latinkić, B V Zeremski, M Lau, L F R01 CA52220-06/CA/NCI NIH HHS/United States Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. England 1996/04/01 Nucleic Acids Res. 1996 Apr 1;24(7):1345-51. doi: 10.1093/nar/24.7.1345.
- Laurent, G., German, N. J., Saha, A. K., de Boer, V. C., Davies, M., Koves, T. R., Dephoure, N., Fischer, F., Boanca, G., Vaitheesvaran, B., Lovitch, S. B., Sharpe, A. H., Kurland, I. J., Steegborn, C., Gygi, S. P., Muoio, D. M., Ruderman, N. B., & Haigis, M. C. 2013. SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase. *Mol Cell*, **50**(5), 686–98.
- Le, T. K. C., Dao, X. D., Nguyen, D. V., Luu, D. H., Bui, T. M. H., Le, T. H., Nguyen, H. T., Le, T. N., Hosaka, T., & Nguyen, T. T. T. 2023. Insulin signaling and its application. *Front Endocrinol (Lausanne)*, **14**, 1226655.
- Lee, J., & Pilch, P. F. 1994. The insulin receptor: structure, function, and signaling. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **266**(2), C319–C334.
- Lee, Joon No, Song, Baoliang, DeBose-Boyd, Russell A., & Ye, Jin. 2006. Sterol-regulated Degradation of Insig-1 Mediated by the Membrane-bound Ubiquitin Ligase gp78\*. *Journal of Biological Chemistry*, **281**(51), 39308–39315.
- Lerner, R. G., Depatie, C., Rutter, G. A., Screatton, R. A., & Balthasar, N. 2009. A role for the CREB co-activator CRT2 in the hypothalamic mechanisms linking glucose sensing with gene regulation. *EMBO Rep*, **10**(10), 1175–81.

- Leszczynska, Katarzyna, Kaur, Sukhbir, Wilson, Eleanor, Bicknell, Roy, & Heath, Victoria L. 2011. The role of RhoJ in endothelial cell biology and angiogenesis. *Biochemical Society Transactions*, **39**(6), 1606–1611.
- Li, Yingchang, Ye, Zhihua, Chen, Shuai, Pan, Zhiwen, Zhou, Qianghua, Li, Yi-Zhuo, Shuai, Wen-di, Kuang, Chun-Mei, Peng, Qi-Hua, Shi, Wei, Mao, Xueli, Liu, Ran-Yi, & Huang, Wenlin. 2018. ARHGEF19 interacts with BRAF to activate MAPK signaling during the tumorigenesis of non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer*, **142**(7), 1379–1391.
- Lima, J. J., Feng, H., Duckworth, L., Wang, J. W., Sylvester, J. E., Kisson, N., & Garg, H. 2007. Association analyses of adrenergic receptor polymorphisms with obesity and metabolic alterations. *Metabolism-Clinical and Experimental*, **56**(6), 757–765.
- Lissner, L., & Heitmann, B. L. 1995. Dietary fat and obesity: evidence from epidemiology. *Eur J Clin Nutr*, **49**(2), 79–90.
- Liu, Di, Liang, Xiaochun, & Zhang, Hong. 2016. Effects of High Glucose on Cell Viability and Differentiation in Primary Cultured Schwann Cells: Potential Role of ERK Signaling Pathway. *Neurochemical Research*, **41**(6), 1281–1290.
- Lledo, Pierre-Marie, Verniert, Philippe, Vincent, Jean-Didier, Mason, William T., & Zorec, Robert. 1993. Inhibition of Rab3B expression attenuates Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis in rat anterior pituitary cells. *Nature*, **364**(6437), 540–544.
- Luo, Man-Li, Gong, Chang, Chen, Chun-Hau, Hu, Hai, Huang, Pengyu, Zheng, Min, Yao, Yandan, Wei, Shuo, Wulf, Gerburg, Lieberman, Judy, Zhou, Xiao Zhen, Song, Erwei, & Lu, Kun Ping. 2015. The Rab2A GTPase Promotes Breast Cancer Stem Cells and Tumorigenesis via Erk Signaling Activation. *Cell Reports*, **11**(1), 111–124.
- López-Mateo, Irene, Villaronga, M. Ángeles, Llanos, Susana, & Belandia, Borja. 2012. The transcription factor CREBZF is a novel positive regulator of p53. *Cell Cycle*, **11**(20), 3887–3895. doi: 10.4161/cc.22133.
- Ma, L., Robinson, L. N., & Towle, H. C. 2006. ChREBP center dot Mlx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *Journal of Biological Chemistry*, **281**(39), 28721–28730. Ma, Lin Robinson, Luke N. Towle, Howard C. 1083-351x.
- Maedera, Shotaro, Mizuno, Tadahaya, Ishiguro, Hiromu, Ito, Takuya, Soga, Tomoyoshi, & Kusuhara, Hiroyuki. 2019. GLUT6 is a lysosomal transporter that is regulated by inflammatory stimuli and modulates glycolysis in macrophages. *FEBS Letters*, **593**(2), 195–208.
- Mahajan, Anubha, Taliun, Daniel, Thurner, Matthias, Robertson, Neil R., Torres, Jason M., Rayner, N. William, Payne, Anthony J., Steinthorsdottir, Valgerdur, Scott, Robert A., Grarup, Niels, Cook, James P., Schmidt, Ellen M., Wuttke, Matthias, Sarnowski,

- Chloé, Mägi, Reedik, Nano, Jana, Gieger, Christian, Trompet, Stella, Lecoeur, Cécile, Preuss, Michael H., Prins, Bram Peter, Guo, Xiuqing, Bielak, Lawrence F., Below, Jennifer E., Bowden, Donald W., Chambers, John Campbell, Kim, Young Jin, Ng, Maggie C. Y., Petty, Lauren E., Sim, Xueling, Zhang, Weihua, Bennett, Amanda J., Bork-Jensen, Jette, Brummett, Chad M., Canouil, Mickaël, Eckardt, Kai-Uwe, Fischer, Krista, Kardia, Sharon L. R., Kronenberg, Florian, Läll, Kristi, Liu, Ching-Ti, Locke, Adam E., Luan, Jian'an, Ntalla, Ioanna, Nylander, Vibe, Schönherr, Sebastian, Schurmann, Claudia, Yengo, Loïc, Bottinger, Erwin P., Brandslund, Ivan, Christensen, Cramer, Dedoussis, George, Florez, Jose C., Ford, Ian, Franco, Oscar H., Frayling, Timothy M., Giedraitis, Vilmantas, Hackinger, Sophie, Hattersley, Andrew T., Herder, Christian, Ikram, M. Arfan, Ingelsson, Martin, Jørgensen, Marit E., Jørgensen, Torben, Kriebel, Jennifer, Kuusisto, Johanna, Ligthart, Symen, Lindgren, Cecilia M., Linneberg, Allan, Lyssenko, Valeriya, Mamakou, Vasiliki, Meitinger, Thomas, Mohlke, Karen L., Morris, Andrew D., Nadkarni, Girish, Pankow, James S., Peters, Annette, Sattar, Naveed, Stančáková, Alena, Strauch, Konstantin, Taylor, Kent D., Thorand, Barbara, Thorleifsson, Gudmar, Thorsteinsdottir, Unnur, Tuomilehto, Jaakko, Witte, Daniel R., Dupuis, Josée, Peyser, Patricia A., Zeggini, Eleftheria, Loos, Ruth J. F., Froguel, Philippe, Ingelsson, Erik, Lind, Lars, Groop, Leif, Laakso, Markku, Collins, Francis S., Jukema, J. Wouter, Palmer, Colin N. A., Grallert, Harald, Metspalu, Andres, *et al.* . 2018. Fine-mapping type 2 diabetes loci to single-variant resolution using high-density imputation and islet-specific epigenome maps. *Nature Genetics*, **50**(11), 1505–1513.
- Mann, W. Alexander, Usadel, Klaus-Henning, Wahl, Peter, & Fischli, Stefan. 2018. *Diabetologie und Stoffwechsel*. 4., überarbeitete auflage edn. Georg Thieme Verlag.
- Marin-Valencia, Isaac, Gerondopoulos, Andreas, Zaki, Maha S., Ben-Omran, Tawfeg, Almureikhi, Mariam, Demir, Ercan, Gumez-Gamboa, Alicia, Gregor, Anne, Issa, Mahmoud Y., Appelhof, Bart, Roosing, Susanne, Musaev, Damir, Rosti, Basak, Wirth, Sara, Stanley, Valentina, Baas, Frank, Barr, Francis A., & Gleeson, Joseph G. 2017. Homozygous Mutations in TBC1D23 Lead to a Non-degenerative Form of Pontocerebellar Hypoplasia. *The American Journal of Human Genetics*, **101**(3), 441–450.
- McCubrey, James A., Steelman, Linda S., Chappell, William H., Abrams, Stephen L., Wong, Ellis W. T., Chang, Fumin, Lehmann, Brian, Terrian, David M., Milella, Michele, Tafuri, Agostino, Stivala, Franca, Libra, Massimo, Basecke, Jorg, Evangelisti, Camilla, Martelli, Alberto M., & Franklin, Richard A. 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1773**(8), 1263–1284.
- Mellon, P. L., Windle, J. J., Goldsmith, P. C., Padula, C. A., Roberts, J. L., & Weiner, R. I. 1990. immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron*, **5**(1), 1–10.
- Michishita, Eriko, McCord, Ronald A., Berber, Elisabeth, Kioi, Mitomu, Padilla-Nash, Hesus, Damian, Mara, Cheung, Peggie, Kusumoto, Rika, Kawahara, Tiara L. A., Barrett,

- J. Carl, Chang, Howard Y., Bohr, Vilhelm A., Ried, Thomas, Gozani, Or, & Chua, Katrin F. 2008. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature*, **452**(7186), 492–496.
- Misra, V., Rapin, N., Akhova, O., Bainbridge, M., & Korchinski, P. 2005. Zhangfei is a potent and specific inhibitor of the host cell factor-binding transcription factor Luman. *J Biol Chem*, **280**(15), 15257–66.
- Montminy, M. R., & Bilezikjian, L. M. 1987. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature*, **328**(6126), 175–8. Montminy, M R Bilezikjian, L M Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. England 1987/07/09 Nature. 1987 Jul 9-15; 328(6126):175-8. doi: 10.1038/328175a0.
- Morimoto, Shinya, Nishimura, Noriyuki, Terai, Tomoya, Manabe, Shinji, Yamamoto, Yasuyo, Shinahara, Wakako, Miyake, Hidenori, Tashiro, Seiki, Shimada, Mitsuo, & Sasaki, Takuya. 2005. Rab13 Mediates the Continuous Endocytic Recycling of Occludin to the Cell Surface\*. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(3), 2220–2228.
- Morris, Ken A., & Gold, Paul E. 2013. Epinephrine and glucose modulate training-related CREB phosphorylation in old rats: Relationships to age-related memory impairments. *Experimental Gerontology*, **48**(2), 115–127.
- Morselli, E., Maiuri, M. C., Markaki, M., Megalou, E., Pasparaki, A., Palikaras, K., Criollo, A., Galluzzi, L., Malik, S. A., Vitale, I., Michaud, M., Madeo, F., Tavernarakis, N., & Kroemer, G. 2010. Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death & Disease*, **1**(1), e10–e10.
- Mosaddeghzadeh, Niloufar, & Ahmadian, Mohammad Reza. 2021. The RHO Family GT-Pases: Mechanisms of Regulation and Signaling. *Cells*, **10**(7), 1831.
- Munafó, Daniela B., & Colombo, María I. 2002. Induction of Autophagy Causes Dramatic Changes in the Subcellular Distribution of GFP-Rab24. *Traffic*, **3**(7), 472–482.
- Netzker, Roland, & Deutzmann, Rainer. 2022a. *Die Adenylatzyklen*. 5. vollständig überarbeitete auflage edn. Georg Thieme Verlag KG.
- Netzker, Roland, & Deutzmann, Rainer. 2022b. *Die Phospholipase Cβ*. 5. vollständig überarbeitete auflage edn. Georg Thieme Verlag KG.
- Nishitani, K., Hayakawa, K., & Tanaka, S. 2019. Extracellular glucose levels in cultures of undifferentiated mouse trophoblast stem cells affect gene expression during subsequent differentiation with replicable cell line-dependent variation. *J Reprod Dev*, **65**(1), 19–27.
- Olson, Michael F., & Marais, Richard. 2000. Ras protein signalling. *Seminars in Immunology*, **12**(1), 63–73.

- Ortega-Prieto, P., & Postic, C. 2019. Carbohydrate Sensing Through the Transcription Factor ChREBP. *Front Genet*, **10**, 472.
- Ottosson-Laakso, E., Krus, U., Storm, P., Prasad, R. B., Oskolkov, N., Ahlqvist, E., Fadista, J., Hansson, O., Groop, L., & Vikman, P. 2017. Glucose-Induced Changes in Gene Expression in Human Pancreatic Islets: Causes or Consequences of Chronic Hyperglycemia. *Diabetes*, **66**(12), 3013–3028.
- Outeiro, Tiago Fleming, Kontopoulos, Eirene, Altmann, Stephen M., Kufareva, Irina, Strathearn, Katherine E., Amore, Allison M., Volk, Catherine B., Maxwell, Michele M., Rochet, Jean-Christophe, McLean, Pamela J., Young, Anne B., Abagyan, Ruben, Feany, Mel B., Hyman, Bradley T., & Kazantsev, Aleksey G. 2007. Sirtuin 2 Inhibitors Rescue  $\alpha$ -Synuclein-Mediated Toxicity in Models of Parkinson's Disease. *Science*, **317**(5837), 516–519.
- Paganini, Simona, Guidetti, Gianni Francesco, Catricalà, Silvia, Trionfini, Piera, Panelli, Simona, Balduini, Cesare, & Torti, Mauro. 2006. Identification and biochemical characterization of Rap2C, a new member of the Rap family of small GTP-binding proteins. *Biochimie*, **88**(3), 285–295.
- Pan, Xiaojing, Eathiraj, Sudharshan, Munson, Mary, & Lambright, David G. 2006. TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature*, **442**(7100), 303–306.
- Peeters, Anna, Barendregt, Jan J., Willekens, Frans, Mackenbach, Johan P., Mamun, Abdullah Al, & Bonneux, Luc. 2003. Obesity in Adulthood and Its Consequences for Life Expectancy: A Life-Table Analysis. *Annals of Internal Medicine*, **138**(1), 24–32. doi: 10.7326/0003-4819-138-1-200301070-00008.
- Pellinen, Teijo, Arjonen, Antti, Vuoriluoto, Karoliina, Kallio, Katja, Fransén, Jack A.M., & Ivaska, Johanna. 2006. Small GTPase Rab21 regulates cell adhesion and controls endosomal traffic of  $\beta$ 1-integrins. *Journal of Cell Biology*, **173**(5), 767–780.
- Peralta, Eigen R., Martin, Brent C., & Edinger, Aimee L. 2010. Differential Effects of TBC1D15 and Mammalian Vps39 on Rab7 Activation State, Lysosomal Morphology, and Growth Factor Dependence\*. *Journal of Biological Chemistry*, **285**(22), 16814–16821.
- Pertz, Olivier, Hodgson, Louis, Klemke, Richard L., & Hahn, Klaus M. 2006. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature*, **440**(7087), 1069–1072.
- Povel, C. M., Boer, J. M. A., Reiling, E., & Feskens, E. J. M. 2011. Genetic variants and the metabolic syndrome: a systematic review. *Obesity Reviews*, **12**(11), 952–967.
- Prendergast, George C. 2001. Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, **1**(2), 162–168.

- Pugazhenthii, S., Boras, T., O'Connor, D., Meintzer, M. K., Heidenreich, K. A., & Reusch, J. E. 1999. Insulin-like growth factor I-mediated activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein in PC12 cells. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase-mediated pathway. *J Biol Chem*, **274**(5), 2829–37.
- Raamsdonk, Catherine D. Van, Griewank, Klaus G., Crosby, Michelle B., Garrido, Maria C., Vemula, Swapna, Wiesner, Thomas, Obenauf, Anna C., Wackernagel, Werner, Green, Gary, Bouvier, Nancy, Sozen, M. Mert, Baimukanova, Gail, Roy, Ritu, Heguy, Adriana, Dolgalev, Igor, Khanin, Raya, Busam, Klaus, Speicher, Michael R., O'Brien, Joan, & Bastian, Boris C. 2010. Mutations in GNA11 in Uveal Melanoma. *New England Journal of Medicine*, **363**(23), 2191–2199.
- Ramos, Joe W. 2008. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **40**(12), 2707–2719.
- Rassow, Joachim. 2022. *Energiestoffwechsel II: Kataboler Stoffwechsel und ATP-Synthese*. 5. vollständig überarbeitete auflage edn. Georg Thieme Verlag KG.
- Rescher, Ursula, & Gerke, Volker. 2008. S100A10/p11: family, friends and functions. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, **455**(4), 575–582.
- Richardson, P. M., & Zon, L. I. 1995. Molecular cloning of a cDNA with a novel domain present in the *tre-2* oncogene and the yeast cell cycle regulators BUB2 and *cdc16*. *Oncogene*, **11**(6), 1139–48.
- Rodgers, Joseph T., Lerin, Carlos, Haas, Wilhelm, Gygi, Steven P., Spiegelman, Bruce M., & Puigserver, Pere. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1. *Nature*, **434**(7029), 113–118.
- Rui, Liangyou, Yuan, Minsheng, Frantz, Daniel, Shoelson, Steven, & White, Morris F. 2002. SOCS-1 and SOCS-3 Block Insulin Signaling by Ubiquitin-mediated Degradation of IRS1 and IRS2\*. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(44), 42394–42398.
- Sakamoto, Kei, & Holman, Geoffrey D. 2008. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, **295**(1), E29–E37.
- Saklayen, M. G. 2018. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep*, **20**(2), 12. 1534-3111 Saklayen, Mohammad G Journal Article Review United States 2018/02/27 Curr Hypertens Rep. 2018 Feb 26;20(2):12. doi: 10.1007/s11906-018-0812-z.
- Samatar, Ahmed A., & Poulikakos, Poulikos I. 2014. Targeting RAS–ERK signalling in cancer: promises and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, **13**(12), 928–942.
- Sampieri, L., Di Giusto, P., & Alvarez, C. 2019. CREB3 Transcription Factors: ER-Golgi Stress Transducers as Hubs for Cellular Homeostasis. *Front Cell Dev Biol*, **7**, 123.

- Sandí, María-José, Marshall, Christopher B., Balan, Marc, Coyaud, Étienne, Zhou, Ming, Monson, Daniel M., Ishiyama, Noboru, Chandrakumar, Arun A., La Rose, José, Couzens, Amber L., Gingras, Anne-Claude, Raught, Brian, Xu, Wei, Ikura, Mitsuhiko, Morrison, Deborah K., & Rottapel, Robert. 2017. MARK3-mediated phosphorylation of ARHGAP2 couples microtubules to the actin cytoskeleton to establish cell polarity. *Science Signaling*, **10**(503), eaan3286.
- Satyanarayana, Ande, Gudmundsson, Kristbjorn Orri, Chen, Xiu, Coppola, Vincenzo, Tessarollo, Lino, Keller, Jonathan R., & Hou, Steven X. 2010. RapGEF2 is essential for embryonic hematopoiesis but dispensable for adult hematopoiesis. *Blood*, **116**(16), 2921–2931.
- Seamon, K B, Padgett, W, & Daly, J W. 1981. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **78**(6), 3363–3367.
- Seitz, Susanne, Kwon, Yun, Hartleben, Götz, Jülg, Julia, Sekar, Revathi, Krahmer, Natalie, Najafi, Bahar, Loft, Anne, Gancheva, Sofiya, Stemmer, Kerstin, Feuchtinger, Annette, Hrabe de Angelis, Martin, Müller, Timo D., Mann, Matthias, Blüher, Matthias, Roden, Michael, Berriel Diaz, Mauricio, Behrends, Christian, Gilleron, Jerome, Herzig, Stephan, & Zeigerer, Anja. 2019. Hepatic Rab24 controls blood glucose homeostasis via improving mitochondrial plasticity. *Nature Metabolism*, **1**(10), 1009–1026.
- Senatore, Emanuela, Chiuso, Francesco, Rinaldi, Laura, Intartaglia, Daniela, Delle Donne, Rossella, Pedone, Emilia, Catalanotti, Bruno, Pirone, Luciano, Fiorillo, Bianca, Moraca, Federica, Giamundo, Giuliana, Scala, Giovanni, Raffener, Andrea, Torres-Quesada, Omar, Stefan, Eduard, Kwiatkowski, Marcel, van Pijkeren, Alienke, Morleo, Manuela, Franco, Brunella, Garbi, Corrado, Conte, Ivan, & Felicciello, Antonio. 2021. The TBC1D31/praja2 complex controls primary ciliogenesis through PKA-directed OFD1 ubiquitylation. *The EMBO Journal*, **40**(10), e106503.
- Shin, John J. H., Gillingham, Alison K., Begum, Farida, Chadwick, Jessica, & Munro, Sean. 2017. TBC1D23 is a bridging factor for endosomal vesicle capture by golgins at the trans-Golgi. *Nature Cell Biology*, **19**(12), 1424–1432.
- Siehler, Sandra. 2009. Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology*, **158**(1), 41–49.
- Siljee, Jacqueline E., Wang, Yi, Bernard, Adelaide A., Ersoy, Baran A., Zhang, Sumei, Marley, Aaron, Von Zastrow, Mark, Reiter, Jeremy F., & Vaisse, Christian. 2018. Subcellular localization of MC4R with ADCY3 at neuronal primary cilia underlies a common pathway for genetic predisposition to obesity. *Nature Genetics*, **50**(2), 180–185.
- Silver, I. A., & Erecińska, M. 1994. Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon

- limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals. *J Neurosci*, **14**(8), 5068–76.
- Staiger, Harald, Stefan, Norbert, Kellerer, Monika, & Häring, Hans-Ulrich. 2014. *Insulin – das wichtigste anabole Hormon*. 9., vollständig überarbeitete auflage edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Statistisches Bundesamt. 2022 (16.12.2022). *Ergebnisse der Todesursachenstatistik für Deutschland - ausführliche 4-stellige ICD-Klassifikation - 2021*. Report. Statistisches Bundesamt.
- Stenmark, Harald. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **10**(8), 513–525.
- Strathmann, M P, & Simon, M I. 1991. G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88**(13), 5582–5586.
- Sun, Yi, Bilan, Philip J., Liu, Zhi, & Klip, Amira. 2010. Rab8A and Rab13 are activated by insulin and regulate GLUT4 translocation in muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(46), 19909–19914.
- Sun, Yixuan, Zhang, Yuqing, Li, Na, Zhang, Hua, Zhou, Libin, & Shao, Li. 2014. Exposure to high levels of glucose increases the expression levels of genes involved in cholesterol biosynthesis in rat islets. *Exp Ther Med*, **8**(3), 991–997.
- Suzuki, R., Lee, K., Jing, E., Biddinger, S. B., McDonald, J. G., Montine, T. J., Craft, S., & Kahn, C. R. 2010. Diabetes and insulin in regulation of brain cholesterol metabolism. *Cell Metab*, **12**(6), 567–79.
- Takahashi, T., Fukuda, K., Pan, J., Kodama, H., Sano, M., Makino, S., Kato, T., Manabe, T., & Ogawa, S. 1999. Characterization of insulin-like growth factor-1-induced activation of the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circulation Research*, **85**(10), 884–891.
- Tao, Weikang, Pennica, Diane, Xu, Lifeng, Kalejta, Robert F., & Levine, Arnold J. 2001. Wrch-1, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1. *Genes & Development*, **15**(14), 1796–1807.
- Thiesen, Signe, Kübart, S., Ropers, H. H., & Nothwang, H. G. 2000. Isolation of Two Novel Human RhoGEFs, ARHGEF3 and ARHGEF4, in 3p13-21 and 2q22. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **273**(1), 364–369.
- Thomas, Janice D, Zhang, Yan-Jie, Wei, Yue-Hua, Cho, Jun-Hung, Morris, Laura E, Wang, Hui-Yun, & Zheng, X. F. Steven. 2014. Rab1A Is an mTORC1 Activator and a Colorectal Oncogene. *Cancer Cell*, **26**(5), 754–769.

- Tian, Zhennan, Yao, Guodong, Song, Hongtao, Zhou, Yang, & Geng, Jingshu. 2014. IGF2R Expression is Associated with the Chemotherapy Response and Prognosis of Patients with Advanced NSCLC. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **34**(5), 1578–1588.
- Touvier, Thierry, Conte-Auriol, Françoise, Briand, Olivier, Cudejko, Céline, Paumelle, Réjane, Caron, Sandrine, Baugé, Eric, Rouillé, Yves, Salles, Jean-Pierre, Staels, Bart, & Bailleul, Bernard. 2009. LEPROT and LEPROTL1 cooperatively decrease hepatic growth hormone action in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, **119**(12), 3830–3838.
- Vakhrusheva, Olesya, Smolka, Christian, Gajawada, Praveen, Kostin, Sawa, Boettger, Thomas, Kubin, Thomas, Braun, Thomas, & Bober, Eva. 2008. Sirt7 Increases Stress Resistance of Cardiomyocytes and Prevents Apoptosis and Inflammatory Cardiomyopathy in Mice. *Circulation Research*, **102**(6), 703–710.
- Van Raamsdonk, Catherine D., Bezrookove, Vladimir, Green, Gary, Bauer, Jürgen, Gaugler, Lona, O'Brien, Joan M., Simpson, Elizabeth M., Barsh, Gregory S., & Bastian, Boris C. 2009. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature*, **457**(7229), 599–602.
- Vazquez, Berta N, Thackray, Joshua K, Simonet, Nicolas G, Kane-Goldsmith, Noriko, Martinez-Redondo, Paloma, Nguyen, Trang, Bunting, Samuel, Vaquero, Alejandro, Tischfield, Jay A, & Serrano, Lourdes. 2016. SIRT7 promotes genome integrity and modulates non-homologous end joining DNA repair. *The EMBO Journal*, **35**(14), 1488–1503.
- Verdin, Eric, Hirschey, Matthew D., Finley, Lydia W. S., & Haigis, Marcia C. 2010. Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. *Trends in Biochemical Sciences*, **35**(12), 669–675.
- Vossler, Mark R., Yao, Hong, York, Randall D., Pan, Ming-Gui, Rim, Caroline S., & Stork, Philip J. S. 1997. cAMP Activates MAP Kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-Dependent Pathway. *Cell*, **89**(1), 73–82.
- Wang, Yuzhen, Chen, Taoyong, Han, Chaofeng, He, Donghua, Liu, Haibo, An, Huazhang, Cai, Zhen, & Cao, Xuetao. 2007. Lysosome-associated small Rab GTPase Rab7b negatively regulates TLR4 signaling in macrophages by promoting lysosomal degradation of TLR4. *Blood*, **110**(3), 962–971.
- Webert, L., Faro, D., Zeitlmayr, S., Gudermann, T., & Breit, A. 2022. Analysis of the Glucose-Dependent Transcriptome in Murine Hypothalamic Cells. *Cells*, **11**(4).
- Wong, Carmen Chak-Lui, Wong, Chun-Ming, Ko, Frankie Chi-Fat, Chan, Lo-Kong, Ching, Yick-Pang, Yam, Judy Wai-Ping, & Ng, Irene Oi-lin. 2008. Deleted in Liver Cancer 1 (DLC1) Negatively Regulates Rho/ROCK/MLC Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *PLOS ONE*, **3**(7), e2779.

- Wu, Jia, Cheng, Dandan, Liu, Li, Lv, Zhengbing, & Liu, Kuancheng. 2019. TBC1D15 affects glucose uptake by regulating GLUT4 translocation. *Gene*, **683**, 210–215.
- Xue, Wen, Krasnitz, Alexander, Lucito, Robert, Sordella, Raffaella, VanAelst, Linda, Cordon-Cardo, Carlos, Singer, Stephan, Kuehnel, Florian, Wigler, Michael, Powers, Scott, Zender, Lars, & Lowe, Scott W. 2008. DLC1 is a chromosome 8p tumor suppressor whose loss promotes hepatocellular carcinoma. *Genes & Development*, **22**(11), 1439–1444.
- Yamamoto, K. K., Gonzalez, G. A., Biggs, W. H., & Montminy, M. R. 1988. Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature*, **334**(6182), 494–498.
- Yamashita, H., Takenoshita, M., Sakurai, M., Bruick, R. K., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Arnot, D., & Uyeda, K. 2001. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**(16), 9116–9121.
- Yamauchi, Toshimasa, Oike, Yuichi, Kamon, Junji, Waki, Hironori, Komeda, Kajuro, Tsuchida, Atsuko, Date, Yukari, Li, Meng-Xian, Miki, Hiroshi, Akanuma, Yasuo, Nagai, Ryozo, Kimura, Satoshi, Saheki, Takeyori, Nakazato, Masamitsu, Naitoh, Takeshi, Yamamura, Kenichi, & Kadowaki, Takashi. 2002. Increased insulin sensitivity despite lipodystrophy in Crebbp heterozygous mice. *Nature Genetics*, **30**(2), 221–226.
- Yan, Jun, Zheng, Yingcheng, Yuan, Peipei, Wang, Shanshan, Han, Song, Yin, Jun, Peng, Biwen, Li, Zhi, Sun, Yan, He, Xiaohua, & Liu, Wanhong. 2021. Novel Host Protein TBC1D16, a GTPase Activating Protein of Rab5C, Inhibits Prototype Foamy Virus Replication. *Frontiers in Immunology*, **12**.
- Yoshimura, Akihiko, Naka, Tetsuji, & Kubo, Masato. 2007. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature Reviews Immunology*, **7**(6), 454–465.
- Zhang, R., Rapin, N., Ying, Z., Shklanka, E., Bodnarchuk, T. W., Verge, V. M., & Misra, V. 2013. Zhangfei/CREB-ZF - a potential regulator of the unfolded protein response. *PLoS One*, **8**(10), e77256.
- Zhang, Xinmin, Odom, Duncan T., Koo, Seung-Hoi, Conkright, Michael D., Canettieri, Gianluca, Best, Jennifer, Chen, Huaming, Jenner, Richard, Herbolsheimer, Elizabeth, Jacobsen, Elizabeth, Kadam, Shilpa, Ecker, Joseph R., Emerson, Beverly, Hogenesch, John B., Unterman, Terry, Young, Richard A., & Montminy, Marc. 2005. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(12), 4459–4464.
- Zhong, Lei, D’Urso, Agustina, Toiber, Debra, Sebastian, Carlos, Henry, Ryan E., Vady-sirisack, Douangson D., Guimaraes, Alexander, Marinelli, Brett, Wikstrom, Jakob D.,

- Nir, Tomer, Clish, Clary B., Vaitheesvaran, Bhavapriya, Iliopoulos, Othon, Kurland, Irwin, Dor, Yuval, Weissleder, Ralph, Shirihai, Orian S., Ellisen, Leif W., Espinosa, Joaquin M., & Mostoslavsky, Raul. 2010. The Histone Deacetylase Sirt6 Regulates Glucose Homeostasis via Hif1 $\alpha$ . *Cell*, **140**(2), 280–293.
- Zhu, Xinying, Qiu, Jinxia, Zhang, Tao, Yang, Yaping, Guo, Shuai, Li, Tianshun, Jiang, Kangfeng, Zahoor, Arshad, Deng, Ganzhen, & Qiu, Changwei. 2020. MicroRNA-188-5p promotes apoptosis and inhibits cell proliferation of breast cancer cells via the MAPK signaling pathway by targeting Rap2c. *Journal of Cellular Physiology*, **235**(3), 2389–2402.
- Zhu, Y., Yan, Y., Principe, D. R., Zou, X., Vassilopoulos, A., & Gius, D. 2014. SIRT3 and SIRT4 are mitochondrial tumor suppressor proteins that connect mitochondrial metabolism and carcinogenesis. *Cancer Metab*, **2**, 15.
- Zhu, Zhesi, Di, Jiehui, Lu, Zheng, Gao, Keyu, & Zheng, Junnian. 2016. Rap2B GTPase: structure, functions, and regulation. *Tumor Biology*, **37**(6), 7085–7093.
- Zick, Yehiel. 2005. Ser/Thr Phosphorylation of IRS Proteins: A Molecular Basis for Insulin Resistance. *Science's STKE*, **2005**(268), pe4–pe4.
- Zimmet, Paul, Magliano, Dianna, Matsuzawa, Yuji, Alberti, George, & Shaw, Jonathan. 2005. The Metabolic Syndrome: A Global Public Health Problem and A New Definition. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, **12**(6), 295–300.
- Zuk, Patricia A., & Elferink, Lisa A. 2000. Rab15 Differentially Regulates Early Endocytic Trafficking\*. *Journal of Biological Chemistry*, **275**(35), 26754–26764.
- Zühlsdorf, A., Jürkenbeck, K., Mehlhose, C., & Spiller, A. 2021. „Süße“-Marketingclaims: Wie verstehen Verbraucher Werbehinweise zu Zuckerreduktion, Süßungsmitteln und anderen süßenden Zutaten auf Lebensmitteln?, Ergebnisse zweier repräsentativer Umfragen. wissenschaftliche Studie im Auftrag des vzbv, Göttingen.

# Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Thomas Gudermann, für das Überlassen des Themas und die freundliche Betreuung. Auch den anderen Mitgliedern meiner Betreuungskommission, Prof. Dr. Ingrid Boekhoff und Prof. Dr. Jochen Seißler, gilt mein Dank für die Begleitung meiner Promotion.

Ein besonderer Dank gilt meinem Arbeitsgruppenleiter, Dr. Andreas Breit, der immer ein offenes Ohr für mich hatte, mir mit Rat und Tat zur Seite stand und ohne dessen Unterstützung ich das Projekt nicht so hätte umsetzen können.

Ich möchte mich außerdem bei den anderen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für die gemeinsame Zeit bedanken. Dr. Dennis Faro und Dr. Sarah Zeitlmayr gilt mein Dank für die geduldige Einarbeitung in die Labormethoden und ihren unverwechselbaren Humor. Außerdem danke ich unserer Technischen Assistentin, Ute Künzel-Mulas, für ihre Unterstützung im Labor.

Mein Dank gilt darüber hinaus dem Förderprogramm für Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Finanzierung meines Projekts und der Studienstiftung des deutschen Volkes für die finanzielle und ideelle Förderung meines Medizinstudiums.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Stefan Kotschi für seine freundschaftliche und wissenschaftliche Unterstützung bedanken.

Bei Dr. Stephanie Wagner bedanke ich mich für ihren motivierenden Rückhalt bei allem, was ich tue, auch beim Anfertigen dieser Doktorarbeit.

Und schließlich gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern, Brigitte Webert-Pabst und Dr. Matthias Webert, die mir mein Studium in München erst ermöglicht und mich stets zur Fertigstellung dieser Doktorarbeit angetrieben haben.