

Aus der Klinik für Innere Medizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# **Effekte von Orexin-A auf die endokrine Funktion der pankreatischen A-Zelle**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Eva Göncz

aus Zalaegerszeg (Ungarn)

Datum der Promotion: 23.06.2013



**Geh nicht nur die glatten Straßen.  
Geh Wege, die noch niemand ging,  
damit Du Spuren hinterlässt und nicht nur Staub.**

**(Antoine de Saint-Exupéry)**

# Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	
<b>II</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	
<b>III</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	
<b>1</b>	<b>Einleitung und Grundlagen</b>	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>Endokrines Pankreas</b>	
1.1.1	Morphologie	14
1.1.2	Physiologische Bedeutung für die Konstanthaltung der Glukosehomöostase	15
1.1.3	Pathophysiologische Bedeutung beim Diabetes mellitus Typ 2	17
1.1.4	Rolle von pankreatischen A-Zellen in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2	18
<b>1.2</b>	<b>Orexin und Rezeptoren</b>	
1.2.1	Synthese und Expression der Orexine und Orexin-Rezeptoren	20
1.2.2	Physiologische und pathophysiologische Bedeutung beim Menschen	24
1.2.3	Rolle von Orexin-A (OXA) für die Regulation des endokrinen Pankreas in Nagetieren	26
<b>1.3</b>	<b>Forkhead-box-Proteine (FoxO)</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>31</b>
3.1.1	Geräte und Labormaterialien	31
3.1.2	Chemikalien und Reagenzien	32
3.1.3	Lösungen und Puffer	34
3.1.4	Antikörper	36
3.1.5	Oligonukleotide und Gensonden	37
3.1.6	Reagenzien und Detektionsmethoden	37
<b>3.2</b>	<b>Zellen</b>	
3.2.1	Glukagon- und Insulin-produzierende Zelllinien	38

<b>3.3</b>	<b>Methoden</b>	
3.3.1	Bestimmung der Glukagon - und Insulinsekretion.....	40
3.3.1.1	Messung der Produktion von Glukagon in InR1-G9-Zellen.....	40
3.3.1.2	Messung der Produktion von Insulin in INS-1-Zellen.....	41
3.3.2	Proteinisolierung.....	41
3.3.3	Detektion der Proteine	
3.3.3.1	Western Blot.....	42
3.3.3.2	Immunfluoreszenz.....	43
3.3.4	RNS-Isolierung.....	44
3.3.5	Quantitative mRNS Bestimmung.....	44
3.3.6	Experimentelle Suppression der <i>FoxO1</i> mRNS-Expression.....	45
3.3.7	Messung der intrazellulären cAMP-Akkumulation.....	46
<b>3.4</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
4.1	Expression von Orexin-Rezeptoren.....	48
4.2	Rolle von Orexin-A (OXA) für die Regulation des endokrinen Pankreas..	50
4.2.1	Effekte von OXA auf die A-Zellen.....	51
4.2.2	Effekte von OXA auf die B-Zellen.....	54
4.3	Effekte von OXA auf die Proglukagon mRNS-Expression.....	55
4.3.1	Charakterisierung von intrazellulären Signaltransduktionskaskaden.....	56
4.3.2	Rolle des Transkriptionsfaktors FoxO1.....	61
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>63</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>73</b>
7.1	Eidesstattliche Versicherung	
7.2	Publikationsliste	
7.3	Danksagung	

# **Abstrakt**

## **Einleitung:**

Orexine sind Neurohormone hypothalamischer Genese, die an der Regulation der Nahrungsaufnahme und Energie-Homöostase des Organismus beteiligt sind.

Aus dem gemeinsamen Vorläufermolekül Preproorexin gespaltene Liganden genannt Orexin-A und Orexin-B (OXA, OXB) zeigen eine hohe Sequenzhomologie zwischen den Spezies und binden mit unterschiedlicher Affinität an zwei G-Protein gekoppelte Orexin-Rezeptoren (OX1R und OX2R). Sowohl Orexin-A als auch seine Rezeptoren werden in dem endokrinen Pankreas exprimiert. Ergebnisse von Tierversuchen und Beobachtungen an Narkolepsie-Patienten, weisen darauf hin, dass Orexin-A an der Regulation der Glukosehomöostase beteiligt ist. Die Wirkung von Orexin-A auf die endokrine Aktivität der pankreatischen B-Zellen wurde mittlerweile durch mehrere Studien belegt. Allerdings sind die Effekte von Orexin-A auf die A-Zelle nicht hinreichend bekannt.

Ziel der Dissertation war daher die Untersuchung der Effekte von Orexin-A auf die endokrine Funktion pankreatischer A-Zellen.

## **Methodik/Ergebnisse:**

Im dem Zusammenhang wurden die Expression von Orexin-Rezeptor 1, die Regulation der Glukagon-Freisetzung sowie der Proglukagon-Genexpression durch Orexin-A untersucht. Des Weiteren wurden die zugrunde liegenden Signaltransduktionsmechanismen identifiziert. Orexin-Rezeptor 1 konnte sowohl auf isolierten pankreatischen Inseln, als auch auf einer Glukagon-produzierenden monoklonalen InR1-G9-Zelllinie nachgewiesen werden. Die Detektion von Orexin-Rezeptor 1 gelang auch in einer monoklonalen Insulin-produzierenden INS-1 Zelllinie. Orexin-A hemmte die Glukagon-Freisetzung. Im Gegensatz dazu, stimulierte Orexin-A die Insulin-Freisetzung. Diese Effekte waren mit einer Änderung der intrazellulären Akkumulation von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und mit der Phosphorylierung des cAMP response element-binding Protein (CREB)- in beiden Zelllinien verbunden. Orexin-A hemmte die Expression von Proglukagon-mRNS und stimulierte die Expression von Proinsulin-mRNS.

Die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) -Signaltransduktionskaskade ließ sich durch die gesteigerte Phosphorylierung von Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-1 (PDK-1) -; Proteinkinase-B (AKT)- und forkhead-box-O1 (FoxO1)–Proteinen nachweisen. Nach pharmakologischer Blockade der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Kaskade waren die inhibitorischen Effekte von Orexin-A auf die Proglukagon mRNA-Expression nicht mehr detektierbar. Die experimentelle Suppression der forkhead-box-O1 Protein-Produktion in InR1-G9 Zellen führte ebenfalls zur Aufhebung der Inhibition der Proglukagon-Genexpression durch Orexin-A.

### **Schlussfolgerung:**

Die vorliegenden Ergebnisse liefern den Beweis dafür, dass Orexin-A mit den pankreatischen A-Zellen direkt interagiert. Orexin-A hemmt die Glukagon-Neusynthese via zyklisches Adenosinmonophosphat sowie Phosphatidylinositol-3-Kinase -abhängige Mechanismen. Die Daten belegen, dass der Transkriptionsfaktor forkhead-box-O1 Protein eine Schlüsselrolle bei der Orexin-A-vermittelten Suppression der Proglukagon-Genexpression spielt. Da eine Fehlregulation pankreatischer A-Zellen zu einer Hyperglukagonämie und dadurch bedingten Verschlechterung der Glukosetoleranz beim Diabetes mellitus Typ 2 führt, kann das Prinzip der Suppression der endokrinen Aktivität pankreatischer A-Zellen durch Orexin-A eine mögliche therapeutische Anwendung bei dieser Stoffwechselerkrankung haben.

## **Abstract**

### **Introduction:**

Orexins are hypothalamic neurohormones regulating feeding behaviour, metabolic homeostasis and energy expenditure. Two isoforms of orexins are known termed as orexin-A and -B, which show highly conserved amino acid sequence homology between species. These peptides are derived from the common precursor protein preproorexin.

Orexins bind to two orphan G-protein coupled receptors, termed orexin receptor 1 and 2. Both, orexin-A and orexin receptor 1 are present in the endocrine pancreas. Results obtained from animal experiments and clinical observations in narcoleptic patients suggest a role of orexin-A in regulating glucose homeostasis.

While the effects of orexin-A on the endocrine activities of pancreatic B-cells have already been demonstrated, the role of this peptide in regulating the functional activities of pancreatic A-cells are not sufficiently known.

### **Methods/Results:**

Aim of the project was the characterisation of the expression of orexin receptor 1 in pancreatic A-cells and regulation of glucagon secretion, as well as proglucagon gene expression. In addition, crucial signal transduction pathways participating in conferring the effects of orexin-A on pancreatic A-cell functions were evaluated.

Orexin receptor 1 was detected in pancreatic A- and B-cells using isolated rat pancreatic islets as well as monoclonal cell lines: glucagon secreting InR1-G9 cells, and insulin-producing INS-1 cells.

Orexin-A inhibited glucagon secretion from InR1-G9 cells while stimulating insulin secretion from INS-1 cells. These effects were accompanied in both cell lines by a rise of intracellular cyclic adenosinmonophosphat (cAMP) and increased phosphorylation of cAMP response element-binding Protein (CREB).

Orexin-A suppressed proglucagon-mRNA expression, while stimulating that of proinsulin. Orexin-A affected the activity of phosphatidylinositol-3-kinase, pyruvate - dehydrogenase-kinase-1 as well as protein kinase-B. In addition orexin-A contributed to the phosphorylation(inactivation) of forkhead-box-O1 proteins. Pharmacological blockade of the phosphatidylinositol-3-kinase pathway prevented orexin-A at inhibiting

proglucagon-mRNA expression. Likewise, experimental suppression of forkhead-box-O1-protein production in InR1-G9 cells prevented orexin-A at inhibiting proglucagon gene expression.

**Summary:**

These results indicate that orexin-A directly influences pancreatic A-cell activities. Orexin-A inhibits glucagon synthesis via cyclic adenosine monophosphat and phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathways. In addition, forkhead-box-O1-proteins play a significant role at conferring the inhibitory effects of orexin-A on proglucagon gene expression.

Dysfunction of pancreatic A-cells strongly contributes to hyperglucagonemia with consecutive worsening of hyperglycemia in type 2 diabetes. Suppressing endocrine activity of the pancreatic A-cells by orexin-A can be a potential therapeutic principle to restore normoglycemia in this metabolic disease.

## Abkürzungsverzeichnis

AKT	PKB = Proteinkinase-B
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin = Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches (cyclic) Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre (complementary) Desoxyribonkleinsäure
CREB	cAMP response element-binding Protein
Cy3	Cyanine-3
DNS	Desoxyribonkleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent (enzymgekoppeltes Immunadsorptions-) Assay
FKS	fetales Kälberserum
Fox	forkhead-box Proteine
FoxO1	forkhead-box-O1 Protein
GFP	grün fluoreszierendes Protein
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine
KRB	Krebs-Ringer Bikarbonat Puffer
MeOH	Methanol
mM	millimolar
$\mu$ M	mikromolar
mRNS	messenger-Ribonukleinsäure
nM	nanomolar
pM	pikomolar
OXA	Orexin-A
OXB	Orexin-B
OX1R	Orexin-Rezeptor 1
OX2R	Orexin-Rezeptor 2
pAKT	phosphoryliertes AKT (Proteinkinase-B)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T:	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit 0,2 % Tween-20
PDK-1	Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-1
pFoxO1	phosphoryliertes FoxO1

PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase-A
pPDK-1	phosphoryliertes PDK-1
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction, (Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
RNS	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung (Standard deviation)
SDS	Sodium-dodecyl-sulphate
siRNS	kleine interferierende (small interfering) Ribonukleinsäure
Tris-HCl	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid Puffer

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Lokalisation der Insulin- und Glukagon-immunoreaktiven Zellen im endokrinen Pankreas.
- Abbildung 2: Orexine und Rezeptoren.
- Abbildung 3: Lokalisation von Orexin-Rezeptoren 1 und 2 (OX1R und OX2R) in peripheren Zielorganen.
- Abbildung 4: Immunhistochemische Detektion des Glukagon und OX1R auf Langerhans'schen Inseln des humanen Pankreas.
- Abbildung 5: Interaktion der Orexinneurone mit Neurotransmittern im zentralen Nervensystem.
- Abbildung 6: Rolle der Orexine für die Regulation der Glukosehomöostase.
- Abbildung 7: Phosphatidylinositol-3-Kinase-abhängige Regulation des Proglukagonpromotors.
- Abbildung 8: Proteinnachweis des OX1R auf pankreatischen Inseln.
- Abbildung 9: Proteinnachweis des OX1R auf pankreatischen A- und B-Zellen.
- Abbildung 10: Immunhistochemische Detektion des OX1R auf Langerhans'schen Inseln des Ratten-Pankreas.
- Abbildung 11: Immunzytochemische Detektion des OX1R auf monoklonalen A- und B-Zelllinien.
- Abbildung 12: Effekte von OXA auf die Regulation der Glukagon-Sekretion in InR1-G9-Zellen.
- Abbildung 13: Rolle von OXA für die Regulation der Insulinsynthese in INS-1-Zellen.
- Abbildung 14: Effekte von OXA auf die Proglukagon mRNA-Expression in InR1-G9-Zellen.
- Abbildung 15: Regulation der intrazellulären cAMP-Konzentration in InR1-G9 und INS-1-Zellen durch OXA.
- Abbildung 16: Einfluss von OXA auf die CREB-Phosphorylierung in InR1-G9-Zellen.
- Abbildung 17: Phosphatidylinositol-3-Kinase-abhängige Regulation der Proglukagon mRNA Expression durch OXA.
- Abbildung 18: Detektion von FoxO1 in InR1-G9-Zellen.

Abbildung 19: Rolle von FoxO1 bei der OXA-abhängigen Regulation der Proglukagon-Genexpression in InR1-G9-Zellen.

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1:	Beschreibung der Antikörper
Tabelle 2:	Oligonukleotide und Gensonden
Tabelle 3:	Reagenzien und Detektionsmethoden

# 1 Einleitung und Grundlagen

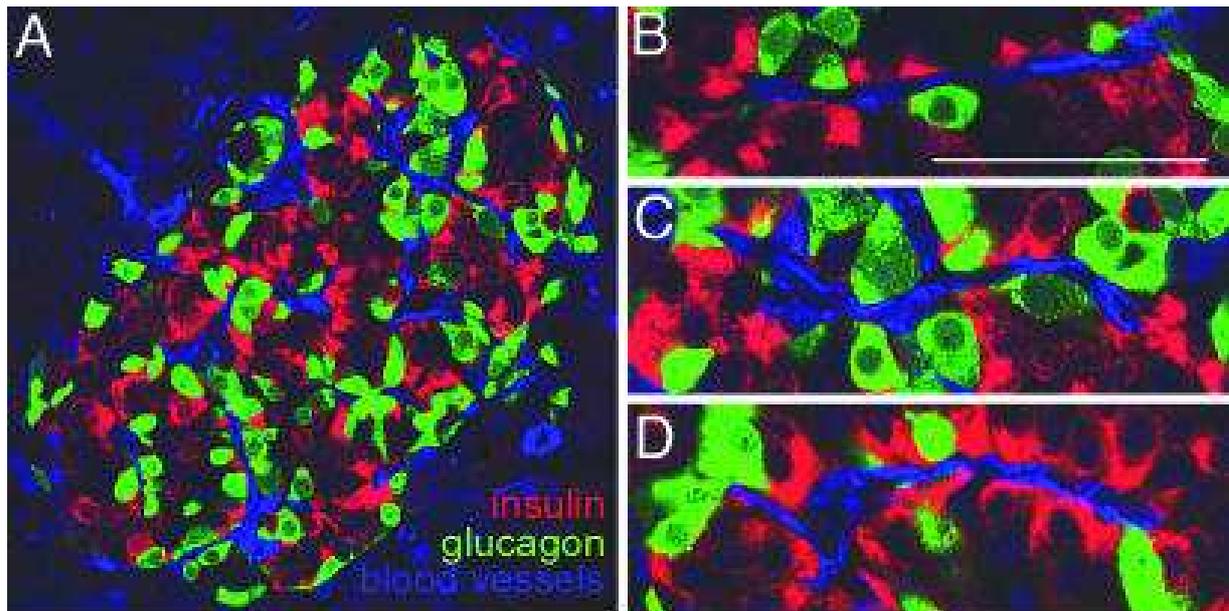
## 1.1 Endokrines Pankreas

### 1.1.1 Morphologie

Das humane Pankreas beinhaltet fast 1 Million Inseln, die ca. 1% der gesamten Organmasse ausmachen. Die Inseln, benannt nach Langerhans, bestehen aus ca. 1000-3000 Zellen und haben eine Größe von 100-500  $\mu\text{m}$  (Quesada I. et al. 2008; Stefan Y. et al. 1983). Die Pankreasinseln beinhalten mindestens 4 endokrin aktive Zelltypen. Etwa 60-70% dieser endokrinen Zellpopulation machen die B-Zellen aus, die für die Insulin-Produktion verantwortlich sind. Ein Fünftel der endokrin aktiven Insel-Zellen machen die Glukagon produzierenden A-Zellen aus (Cabrera O. et al. 2006; Iki K. and Pour P.M. 2007; Quesada I. et al. 2008), 10% sind Somatostatin-produzierende D-Zellen und 5% sind pankreatisches Polypeptid-produzierende PP-Zellen.

Die Verteilung der Zellen innerhalb der Inseln zeigt Spezies-spezifische Unterschiede. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass die B-Zellen sich vorwiegend im Zentrum der Inseln befinden, während die A-Zellen in der Peripherie lokalisiert sind (siehe Abbildung 1). Im humanen Pankreas zeigt sich eher ein heterogenes Verteilungsmuster innerhalb der Inseln, vergleichbar mit Hund und Schwein (Kilimnik G. et al. 2012; Cabrera O. et al. 2006).

Bemerkenswert ist, dass die meisten A-Zellen in einem engen anatomischen Kontakt zu anderen endokrinen Zelltypen stehen (Cabrera O. et al. 2006). Darüber hinaus befinden sich die A-Zellen in unmittelbarer Nähe von venösen und arteriellen Kapillaren (Cabrera O. et al. 2006) (siehe Abbildung 1). Diese Besonderheiten bilden eine morphologische Grundlage für die para-, auto- und endokrine Interaktion der Inselzellen.



**Abbildung 1:**  
**Lokalisation der Insulin- und Glukagon-immunoreaktiven Zellen im endokrinen Pankreas**  
**(Cabrera O. et al. 2006).**

A) Langerhans-Insel des Pankreas mit Darstellung der Insulin (rote Signale)- und Glukagon (grüne Signale)-positiven Inselzellen und der Gefäß-Strukturen (blaue Signale).

B-D) Anatomische Beziehung der endokrinen Zellen zu Blutgefäßen.

### 1.1.2 Physiologische Bedeutung für die Konstanthaltung der Glukosehomöostase

Insulin und Glukagon sind entscheidend an der Regulation der Glukosehomöostase beteiligt. Insulin fördert die Glukose-Utilisation durch die Gewebe und senkt somit den Blutzucker. Die anabole Wirkung spiegelt sich wider, indem Insulin die Glykogensynthese und -speicherung in den Muskel- und Leberzellen fördert. Darüber hinaus fördert Insulin die zelluläre Proteinsynthese aus Vorstufen (Glukose und Aminosäuren). Das katabol wirksame Glukagon sorgt währenddessen für die Glukosemobilisierung und den Proteinabbau. Durch diese gegensätzliche Regulation der Glukoneogenese und Glykogenolyse wird das primäre Ziel, nämlich die Konstanthaltung der Normoglykämie erreicht. Die Freisetzung der beiden funktionell antagonistisch wirkenden Hormone erfolgt abhängig von der Blutzuckerkonzentration.

Die A-Zellen schütten unter Hypoglykämie vermehrt Glukagon aus, während die B-Zellen unter Hyperglykämie sekretorisch hochaktiv sind und Insulin freisetzen. Pankreatische A- und B-Zellen beeinflussen sich gegenseitig im Hinblick auf die Regulation der Hormonsekretion. Die Freisetzung von Glukagon und Insulin unterliegt einem positiven und negativen Feedback, wobei auch eine Vielzahl extrapancreatischer Hormone an der komplexen Regulation des Glukagons und Insulins beteiligt sind.

Ein negativer Feedback-Mechanismus lässt sich zwischen der A- und B-Zelle erkennen. Insulin hemmt die Freisetzung von Glukagon während Glukagon die Insulinsekretion stimuliert (Farhy L.S. et al. 2009). Maruyama et al. beobachteten einen starken Anstieg der Glukagon-Freisetzung am perfundierten Rattenpankreas nachdem die Pankreata mittels Anti-Insulin-Serum perfundiert worden waren (Maruyama H. et al. 1984).

Im Einklang mit diesen Daten konnte die Arbeitsgruppe von Kawamori an Insulin-Rezeptor defizienten A-Zellen der Maus eine gesteigerte Sekretion von Glukagon bei der Hypoglykämie nachweisen (Kawamori D. et al. 2009). Beim absoluten Insulinmangel-Diabetes (Diabetes mellitus Typ 1) konnte im Vergleich zwischen den gesunden Kontrolltieren und den Tieren mit den Insulin-Rezeptor-defizienten A-Zellen kein Unterschied in der Glukagonkonzentration im Plasma festgestellt werden (Kawamori D. et al. 2009).

Ergebnisse von *in vivo* Studien zeigen, dass neben Insulin auch Somatostatin die Freisetzung von Glukagon hemmen kann. Starke et al. haben an Hunden zeigen können, dass sowohl Insulin als auch Somatostatin die Glukagon-Freisetzung unabhängig von der Glukosekonzentration hemmen können. Diese Effekte wurden jedoch nur bei Vorhandensein von suffizient funktionierenden B-Zellen beobachtet (Starke A. et al. 1987). Somatostatin hemmt sowohl die Freisetzung von Insulin als auch die von Glukagon. Die Somatostatin-Sekretion wird wiederum durch Hyperglykämie stimuliert (Brunnicardi F.C. et al 2001).

Diese komplexen, von der Blutzuckerkonzentration abhängigen Interaktionen zwischen den endokrin aktiven Zellen des Pankreas, werden auch durch eine Vielzahl weiterer endogener und exogener Faktoren mit beeinflusst.

Mittlerweile sind die Mechanismen der Glukagonregulation durch Insulin bekannt. Zwei Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Bindung von Insulin an die

korrespondierenden Rezeptoren auf klonalen A-Zellen (InR1-G9) zur Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase-(PI3K)-Signaltransduktionsweges führt, wodurch die Freisetzung von Glukagon gehemmt wird (Quesada I. et al. 2008; González M. et al. 2008; Kaneko K. et al. 1999). Nach Ligandbindung kommt es zur, über den PI3K-Signalweg vermittelten, Änderung der Empfindlichkeit der Ionkanäle, die sich in der Zellmembran der InR1-G9-Zellen befinden. Dies führt zur Membranhyperpolarisation mit einhergehender Hemmung der Glukagon-Freisetzung (Quesada I. et al. 2008).

### **1.1.3 Pathophysiologische Bedeutung beim Diabetes mellitus Typ 2**

Das Hauptmerkmal des Diabetes mellitus Typ 2 ist die Hyperglykämie, wobei sowohl eine periphere Insulin-Resistenz als auch ein Funktionsdefekt der pankreatischen B-Zellen von entscheidender pathophysiologischen Bedeutung sind (Unger R.H. 2008).

Bei der Mehrzahl der Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 wird auch ein Verlust der pankreatischen B-Zellmasse beobachtet. Neben der Abnahme der Anzahl der B-Zellen wird ein relativ erhöhter Anteil an A- und D-Zellmasse beobachtet (Iki K. and Pour P.M. 2007).

Der Verlust der B-Zellfunktion beim Diabetes mellitus Typ 2 ist auf eine Erschöpfung der Insulinsekretion zurückzuführen. Der Defekt ist auf eine dauerhafte kompensatorische Insulinhypersekretion zurück zu führen, um die entstandene Hyperglykämie zu beseitigen. Anfangs sind die B-Zellen noch hypertrophiert und hyperplastisch. Trotz initialer Zunahme der B-Zell-Masse kommt es bereits nach wenigen Wochen einer fortbestehenden Hyperglykämie zur Abnahme der Insulin-Sekretion und Insulin-Neubildung (Fontés G. et al. 2010; Takada K. et al. 1996).

Im späteren Stadium der Erkrankung zeigt sich allerdings eine Atrophie der B-Zellen mit zeitlich fortschreitender Abnahme der Insulinsekretion und nachfolgender Reduktion der Insulinkonzentration im Serum (Takada K. et al. 1996). Die daraus resultierende Hyperglykämie führt zu einem weiteren Verlust der B-Zellfunktion (so genannte Glukosetoxizität).

Als weitere Ursache des B-Zellverlustes werden ebenfalls toxische Wirkungen von Lipiden diskutiert. Lee et al. haben gezeigt, dass die Zunahme der pankreatischen Lipidakkumulation zur Apoptose der B-Zellen führt. Diese Reaktion wird auch durch die Hyperinsulinämie-stimulierte Lipogenese mit einhergehendem Aufbau an Fettmasse verstärkt (Unger R.H. 2008; Lee Y. et al. 1994). In Ratten führte die Normalisierung der Blutzuckerspiegel zum Rückgang der Triglyzerid-Akkumulation in den pankreatischen Inseln (Poitout V. et al. 2002).

Im späteren Verlauf des Diabetes mellitus spielt auch der gesteigerte zelluläre Lipidabbau mit konsekutiver Erhöhung der Lipidkonzentration in der Zirkulation eine Rolle (Grapov D. et al. 2012). Dies führt nicht zur intrazellulären Lipidakkumulation nicht nur in den pankreatischen B-Zellen sondern auch in anderen Zielgeweben des Insulins, sowie zu Lipidablagerungen in Blutgefäßen. Als Folge kommt es zur generalisierten Atherosklerose und Verschlechterung der Insulinempfindlichkeit.

#### **1.1.4 Rolle von pankreatischen A-Zellen bei der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 1 und 2**

Das Hauptzielorgan von Glukagon ist die Leber. Hier steigert Glukagon die endogene Glukoseproduktion und wirkt somit dem Abfall der Glukosenkonzentration im Serum entgegen, indem es die Glukoneogenese und Glykogenolyse steigert. Die beiden wichtigsten Enzyme dieser Stoffwechselwege sind die Glukose-6-Phosphatase (G6PC) und die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-2 (PEPCK-2). Die Expression dieser Enzyme wird abhängig vom Glukagon-Serumspiegel gesteuert. Nach Bindung von Glukagon an seinen hepatischen Rezeptor werden intrazelluläre Signaltransduktionswege, in denen Adenylatcyclase (AC) und zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) beteiligt sind, aktiviert (Unger R.H. 1985). Durch die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel kommt es zur Aktivierung der cAMP-abhängige Protein Kinase. Dies aktiviert die Schüsselenzyme der hepatischen Glukogenese und Glykogenolyse wie Glukose-6-Phosphatase und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-2 (Unger R.H. 1985).

Die relative Erhöhung der A-Zellmasse wurde beim Diabetes mellitus Typ 2 durch eine Vielzahl von Studien belegt (Kilimnik G. et al. 2011; Iki K. and Pour P.M. 2007). Unger et al. haben bereits vor Jahrzehnten auch eine Fehlregulation der pankreatischen A- und B-Zellen als entscheidende pathophysiologische Komponente in der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 diskutiert. Neben der gestörten Insulin-Freisetzung wurde eine absolute oder zumindest relative Hypersekretion von Glukagon beobachtet (Unger RH. et al. 1975). Diese Fehlregulation der A-Zellen wurde insbesondere nach Nahrungsaufnahme bei den Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 berichtet. Statt einer Reduktion der Freisetzung von Glukagon beobachtete man bei diesen Patienten häufig eine fehlende Hemmung oder gar eine paradoxe Steigerung der Glukagon-Sekretion (Maruyama H. et al. 1984).

In einer aktuellen Studie von Lee et al. konnte gezeigt werden, dass in Glukagon-Rezeptor-defizienten Mäusen mit experimentell induziertem Diabetes mellitus keine Hyperglykämie auftrat. Die postprandialen Blutzucker-Werte waren stabil (Lee Y. et al. 2012). Diese Ergebnisse unterstreichen die pathophysiologische Bedeutung pankreatischer A-Zellen beim Diabetes mellitus Typ 2.

Es ist bisher noch nicht endgültig geklärt, ob die Hypersekretion der pankreatischen A-Zellen als Folge einer inadäquaten Hemmung durch Insulin zustande kommt. Möglicherweise spielen auch andere Faktoren dabei eine Rolle, die zu einer Fehlregulation der pankreatischen A-Zellen beim Diabetes mellitus beitragen. Daher ist aus therapeutischer Sicht nicht nur eine Verbesserung der Funktion der pankreatischen B-Zellen, sondern auch der A-Zellen bedeutsam. Allerdings sind die bisherigen Versuche, pankreatische A-Zellfunktion gezielt zu verbessern nicht vom Erfolg gekrönt. Daher ist es wichtig, Faktoren zu identifizieren, die sich für eine therapeutische Beeinflussung (generelle Hemmung) der pankreatischen A-Zellfunktion beim Diabetes mellitus Typ 2 eignen würden.

Zusammenfassend zeigen die aktuellen Daten Hinweise auf die zentrale pathophysiologische Rolle von Glukagon beim Diabetes mellitus. Daher beinhaltet das Prinzip der Glukagon-Sekretionshemmung eine neuartige therapeutische, allerdings noch nicht verwirklichte Option beim Diabetes mellitus Typ 2. Dieses Therapieprinzip wird mittlerweile von einigen größeren pharmazeutischen Unternehmen im Rahmen von präklinischen und klinischen Studien verfolgt.

## 1.2 Orexin und Rezeptoren

### 1.2.1 Synthese und Expression der Orexine und Orexin-Rezeptoren

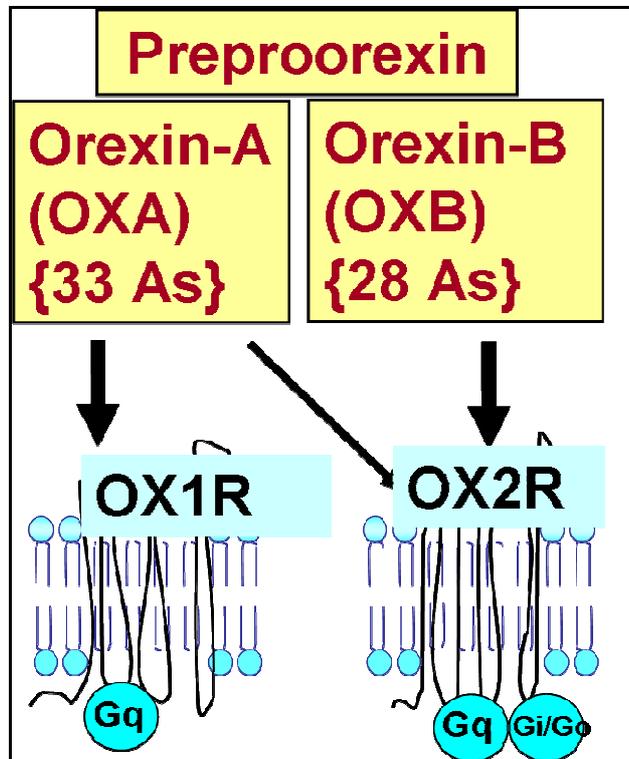
1998 identifizierten Sakurai et al. zwei Peptide Orexin-A (OXA) und Orexin-B (OXB) in Lysaten gewonnen aus Ratten-Hirn (Sakurai T. et al. 1998). Zeitgleich entdeckten de Lecea et al. eine Hypothalamus-spezifische mRNA, deren Proteinprodukt sie in Anlehnung an seine Herkunft Prepro-Hypocretin nannten (de Lecea L. et al. 1998).

Preproorexin wird in zwei Endprodukte, Orexin-A und Orexin-B proteolytisch gespalten. Hypocretin-1 und -2 sind mit OXA und OXB identisch (siehe Abbildung 2). Die beiden Peptide haben eine ähnliche aber nicht identische Aminosäuresequenz, was auch ihre unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften erklärt. OXA besteht aus 33 und OXB aus 28 Aminosäuren; die Sequenzhomologie beträgt 46 % (Sakurai T. et al. 1998). Preproorexin wurde zuerst im Hirn von erwachsenen Ratten nachgewiesen. In vielen Organen, wie dem Herz, der Leber, den Nieren, der Plazenta und den Lungen wird das Peptid gar nicht oder in nicht relevanten Mengen exprimiert (Sakurai T. et al. 1998). Beim Menschen konnte Preproorexin-mRNA in Hypothalamus sowie Nebennieren nachgewiesen werden (Nakabayashi M. et al 2003). Organe wie die Leber, die Lunge, das Herz sowie Dünndarm zeigte keine, während das Pankreas nur eine schwache Signalintensität für Preproorexin mRNA in der RT-PCR aufweist (Nakabayashi M. et al 2003).

Im humanen Gewebe zeigte sich Orexin-A Immunopositivität in Zellen des lateralen Hypothalamus, in Chromogranin-positiven Zellen, epithelialen Zellen sowie Ganglionzellen des myenterischen Plexus des gastrointestinalen Traktes, und in Inselzellen der Pankreas (Nakabayashi M. et al 2003). Der große Teil des humanen Hirns zeigt ebenfalls eine OXA-Positivität mit Ausnahme der Hypophyse. Die intensivste OXA-Immunoreaktivität wurde im Hypothalamus detektiert (Arihara Z. et al. 2000).

Die OXA exprimierenden pankreatischen Zellen zeigten im Großteil auch eine Immunoreaktivität für Insulin. Eine Ko-Expression von OXA und Glukagon konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Nakabayashi M. et al 2003).

Ein bemerkenswerter Unterschied zwischen den beiden Preproorexin Produkten ist, dass nur OXA die Blut-Hirn-Schranke durchqueren kann. Dies geschieht passiv durch Diffusion (Kastin AJ. et al. 1999).



**Abbildung 2: Orexine und Rezeptoren.**

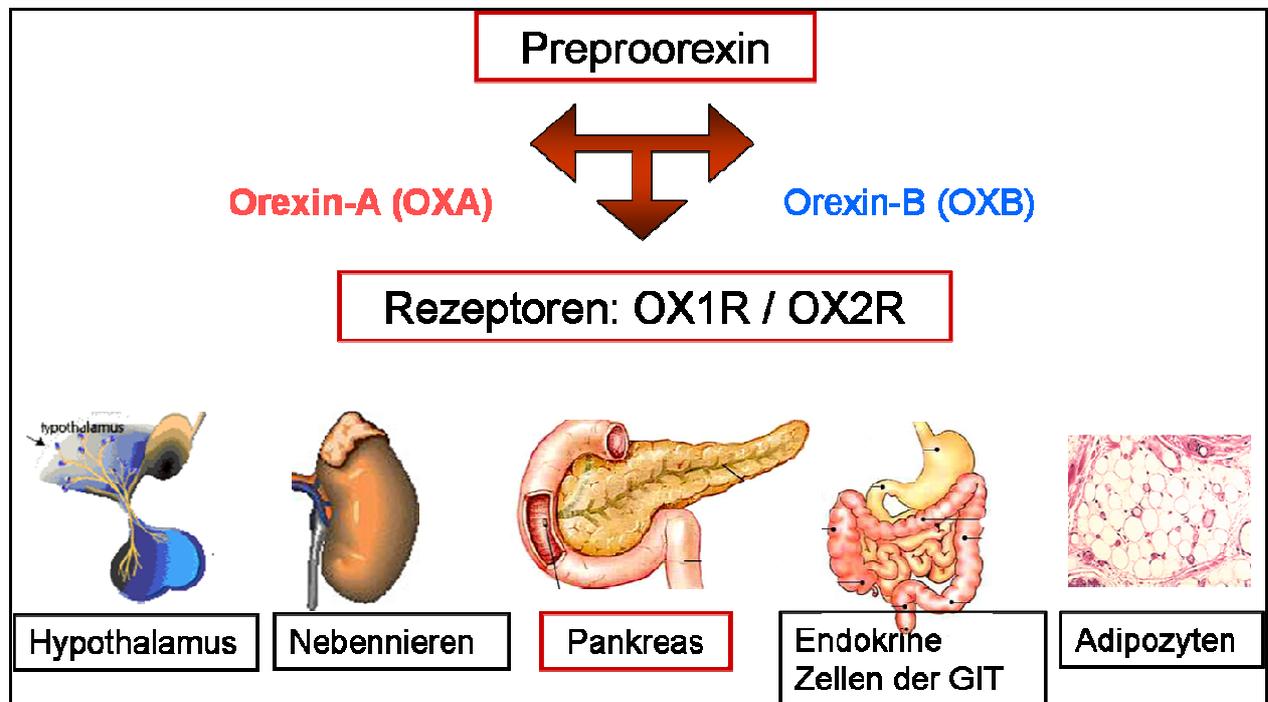
Abkürzungen: As: Aminosäuren; OX1R: Orexin-Rezeptor-1; OX2R: Orexin-Rezeptor-2; G<sub>q</sub>: G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit Selektivität für die q-Untereinheit; Gi/Go: G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit Selektivität für die i/o-Untereinheit.

Orexine binden an zwei verschiedene Rezeptorsubtypen (OXR): den OXR1 und OXR2. Beide Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt. Die Rezeptoren werden gewebsspezifisch exprimiert und binden OXA und OXB mit unterschiedlicher Affinität (Sakurai T. et al. 1998). OX1R bindet OXA mit einer etwa 10-100-fach höheren Affinität im Vergleich zu OXB. OX2R interagiert nur mit OXB (Ammoun S. et al. 2003).

Bemerkenswert ist, dass sowohl die OXR als auch deren Liganden evolutionär stark konserviert sind und dass sich daher die Sequenzen bei verschiedenen Spezies stark ähneln.

Die Rezeptorexpression zeigt ein gewebsspezifisches Muster sowohl beim Menschen als auch in anderen Säugetieren (Heinonen M.V. et al. 2008).

OX1R und OX2R wurden auf verschiedenen endokrin aktiven Gewebszellen nachgewiesen, und zwar in zentralem Nervensystem, Nebennieren, Dünndarm, Pankreas, Ovarien und Fettgewebe (Heinonen MV. et al. 2008; Kirchgessner AL. et al. 1999; Quedraogo R. et al. 2003; Adeghate E. et al. 2010).



**Abbildung 3:**

**Lokalisation von Orexin-Rezeptoren 1 und 2 (OX1R und OX2R) in peripheren Zielorganen.**

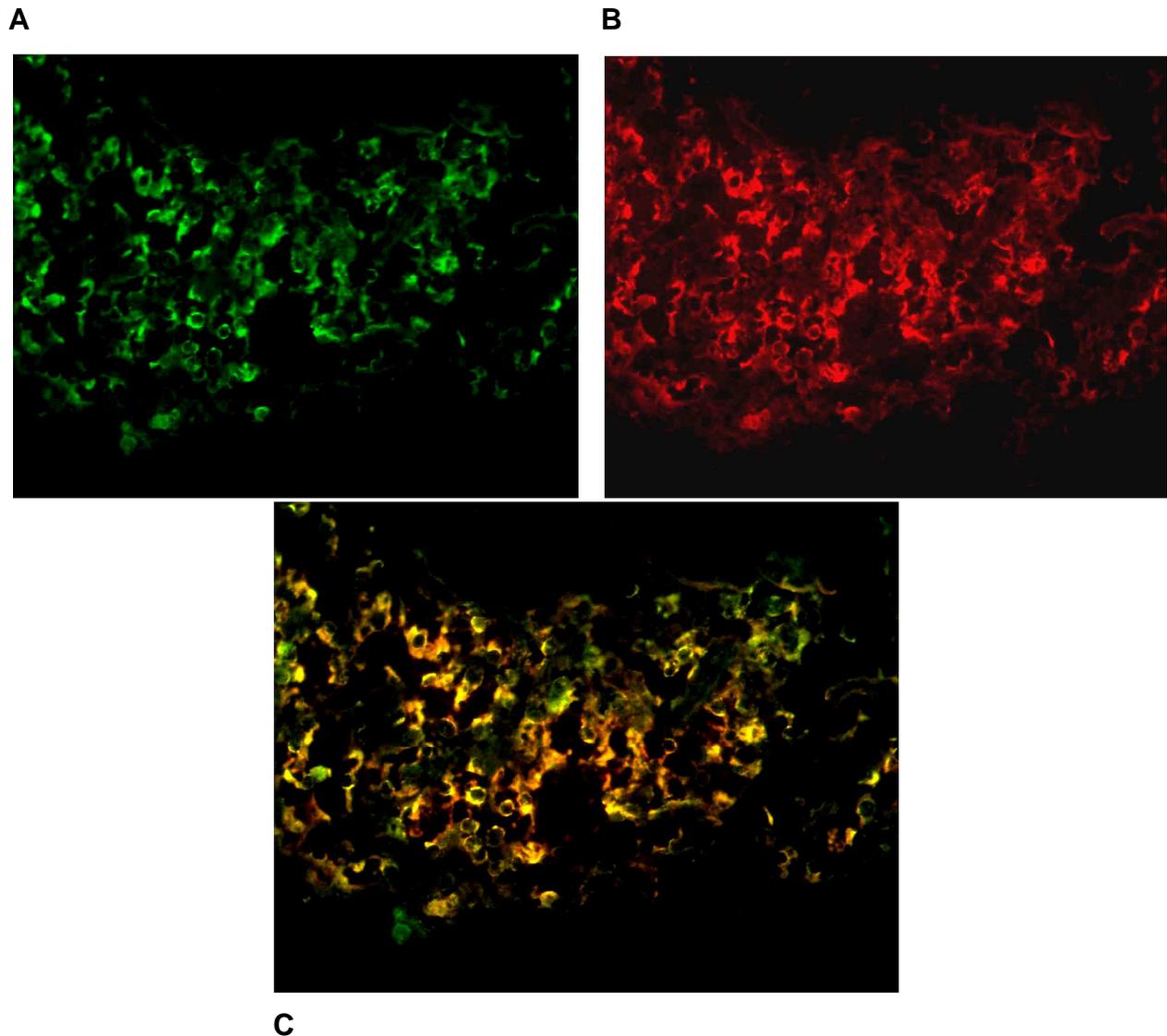
(Modifiziert nach Heinonen M.V. et al. 2008; Ehrström M. et al. 2005, Nakabayashi M. et al. 2003).

GIT: Gastrointestinaltrakt.

Im zentralen Nervensystem ist die Verteilung der OXR-Expression unterschiedlich. Im ventromedialen Hypothalamus gelang der Nachweis von OX1R-mRNS, während OX2R-mRNS eher in den paraventrikulären Bereichen lokalisiert sind (Sakurai T. et al. 1998).

Dieses Expressionsmuster führte zu der Hypothese, dass OXA und OXB möglicherweise eine Rolle bei der hormonellen Steuerung des Essverhaltens, von Stressreaktionen und bei weiteren neuroendokrinen Regulationsmechanismen spielen. Im Ratten-Pankreas zeigte sich eine OX1R Immunreaktivität sowohl in den B- als auch in A-Zellen (Kirchgessner AL. et al. 1999; Quedraogo R. et al. 2003).

Beim Menschen konnte die OXR-Expression sowohl im Pankreas als auch im Magen-Darm-Trakt nachgewiesen werden (Ehrström M. et al. 2005; Kirchgessner A.L. 2002) (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4:**  
**Immunhistochemische Detektion des Glukagons und OX1R auf Langerhans'schen Inseln des humanen-Pankreas.**

Immunzytochemische Färbung des humanen Pankreas mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern:

A) Glukagon-spezifische Immunreaktion (grüne Signale) und

B) OX1R-spezifische Immunreaktion (rote Signale).

C) Ko-Expression von Glukagon- und OX1R (gelbe Signale) (Vergrößerung: 200x).

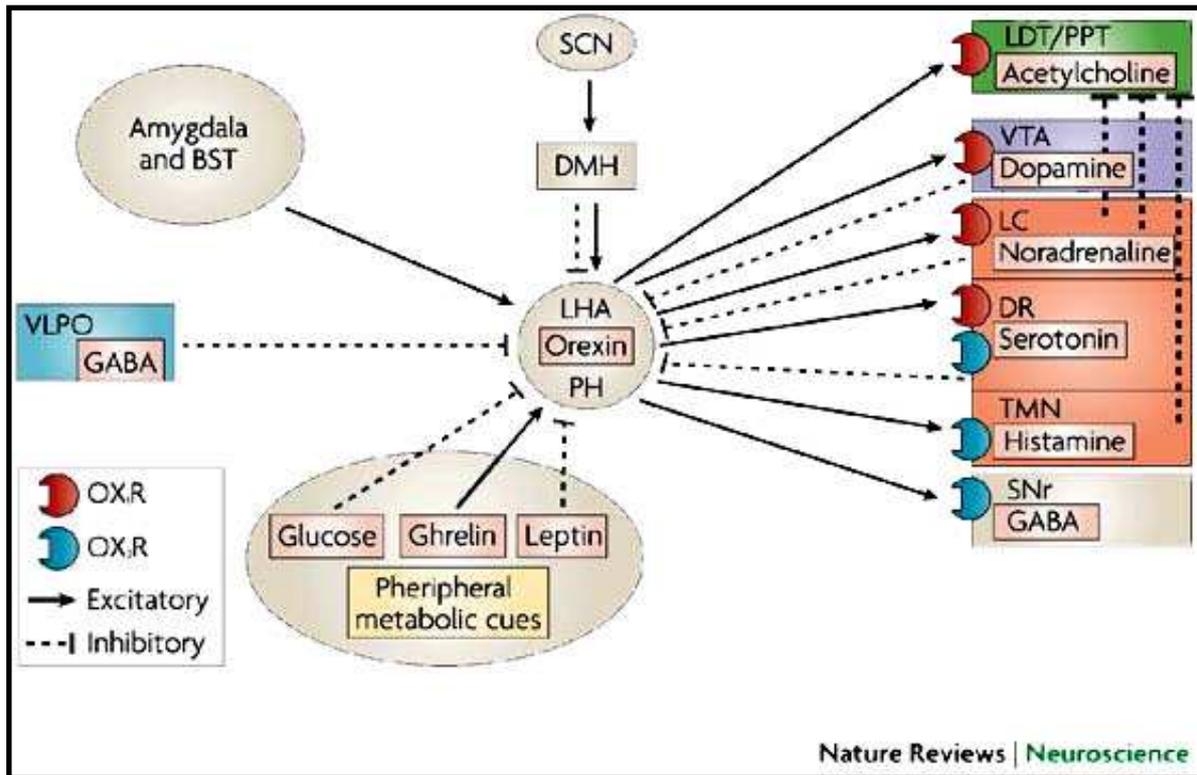
## **1.2.2 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung beim Menschen**

Orexine spielen eine Rolle für die Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus. Eine schwere Form der Störungen des Schlaf-Wach-Zyklus ist die Narkolepsie. Dieses neurologische Krankheitsbild ist durch ein gesteigertes Schlafverhalten mit unüberwindbarer Müdigkeit, plötzlichen Schlafattacken zu nicht adäquaten Zeitpunkten und Katalepsie (plötzliche beidseitig einsetzende Muskelschwäche ohne Bewusstseinsverlust) gekennzeichnet.

Der Arbeitsgruppe von Peyron et al. gelang der Nachweis einer Orexin-Genmutation, die zu einer verminderten Expression von Orexin in Hirngewebe von Patienten mit schwerer, früh einsetzender Narkolepsie führte (Peyron C. et al. 2000).

Weitere Untersuchungen haben nicht nur eine verminderte hypothalamische OXA-Expression belegen können, sondern zeigten verringerte OXA-Konzentrationen im Liquor der Erkrankten (Nishino S. et al. 2001). Mittlerweile gehört die Bestimmung der Liquor-OXA-Konzentration zum diagnostischen Algorithmus bei der Narkolepsie. Das therapeutische Potential der OXR-Antagonisten in der Behandlung der Schlafstörungen wird bereits in Phase III-Studien untersucht (Mieda M., Sakurai T. 2012).

Die Narkolepsie geht mit diversen metabolischen Störungen einher, wie gelegentlicher gestörter Glukosetoleranz und erhöhter Inzidenz von Typ 2 Diabetes (Honda Y. et al. 1986). Aufgrund des Zusammenhangs zwischen erniedrigtem Orexin-Spiegel und gestörter Glukosetoleranz leitet sich ab, dass Orexin einen Einfluss auf die Blutglukose-Regulation haben könnte. Der Zusammenhang wurde in einer Reihe von präklinischen Studien in Tieren und am menschlichen Gewebe in vitro untersucht.



**Abbildung 5:**  
**Interaktion der Orexinneurone mit Neurotransmittern im zentralen Nervensystem**  
**(Sakurai T. et al. 2007, Nature Reviews).**

Rote Halbmonde: OX1R; blaue Halbmonde: OX2R;

→: Stimulation; ---|: Hemmung;

LHA: lateral hypothalamic area= lateraler Hypothalamus; PH= posteriorer Hypothalamus;

VLPO: ventrolateral preoptic area = ventrolaterales präoptisches Areal;

DR: dorsal raphe= dorsale Raphe-Kerne;

GABA: Gamma-aminobutyric acid = Aminobuttersäure (Neurotransmitter-Y);

LC: Locus caeruleus;

LDT: laterodorsal tegmental nucleus und PPT: pedunculopontine tegmental nucleus = tegmentale Kerne;

SNr: substantia nigra pars reticulata =Soemmerring-Ganglion; TMN: tuberomammillary nucleus=  
 tuberomamillärer Kern ; SCN: Nucleus suprachiasmaticus

DMH : Dorsomedialer hypothalamischer Nucleus; BST: Bettkern der Stria terminalis

Direkte Signale erhalten die Orexin-positiven hypothalamische Areale über den dorsomedialen Hypothalamus (DMH) vom Nucleus suprachiasmaticus (SCN), sowie vom limbischen System (aufgezeichnet: Amygdala und Bettkern der Stria terminalis (BST)).

Vermittelt durch Glukose, Ghrelin und Leptin erhalten die Orexinneurone aus den metabolisch aktiven peripheren Geweben ebenfalls weitere Signale.

### **1.2.3 Rolle von Orexin-A (OXA) für die Regulation des endokrinen Pankreas in Nagetieren**

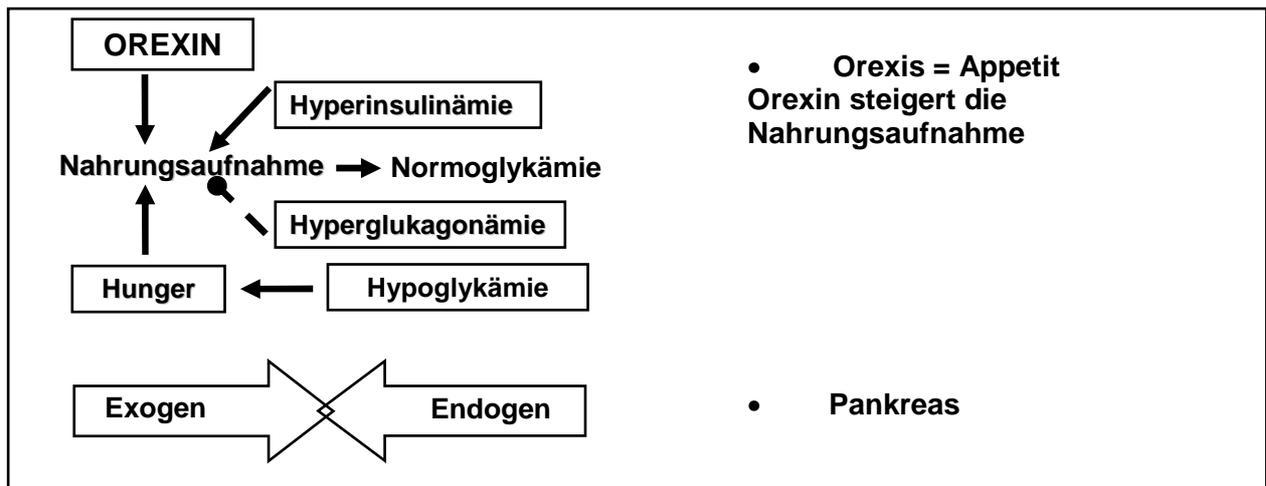
Unter Hypoglykämie bzw. im Hungerzustand wurde eine erhöhte Expression von Preproorexin auf mRNA-Ebene in Zellen des lateralen Hypothalamus nachgewiesen (Sakurai T. et al. 1998). Weitere Untersuchungen ergaben ebenfalls Hinweise darauf, dass die Glukose-Serumkonzentration die hypothalamische Expression von OXA und Preproorexin reguliert. Gallmann et al. detektierten erhöhte OXA Expression in Ratten bei der Insulin-induzierten Hypoglykämie (Gallmann E. et al. 2005).

Auf die Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen von OXA und Glukose wiesen die Untersuchungen von Quedraogo et al. hin. Im perfundierten Rattenpankreas wurde eine erhöhte OXA-Freisetzung unter Hypoglykämie gemessen. Dieser Effekt kehrte sich bei Hyperglykämie um (Quedraogo R. et al. 2003).

Die funktionelle Interaktion zwischen Insulin und OXA belegen die Untersuchungen von Nowak et al. am perfundierten Ratten-Pankreas, die zeigten, dass OXA konzentrationsabhängig die Insulin-Freisetzung stimulieren kann (Nowak KW. et al. 2005). Tsuneki et al. wiesen nach, dass Orexin-Mangel zu einer gestörten Glukosetoleranz und erhöhter Insulin-Resistenz im Alter führt. Im Orexin-Knock-Out-Mausmodell konnte eine Abschwächung der Insulinwirksamkeit in der Leber sowie in Muskelzellen gezeigt werden (Tsuneki H. et al. 2002, 2008).

Eine weitere Studie dieser Gruppe zeigte ebenfalls, dass die Applikation von OXA zur Senkung der Glukosekonzentration im Serum führt, sowohl in gesunden als auch in Insulin-defizienten diabetischen Mäusen (entspricht dem humanen Diabetes mellitus Typ 1) (Tsuneki H. et al. 2002, 2008). Da OXA in Abwesenheit von Insulin wirkte, ergab sich die Vermutung dass der blutzuckersenkende Effekt von OXA möglicherweise durch eine Hemmung der Freisetzung von Glukagon vermittelt wird.

Im Einklang mit dieser Hypothese postulierten Ehrström et al., dass OXA die Freisetzung von Glukagon hemmen kann. In Ratten konnte nach intravenöser OXA-Applikation eine Senkung der Plasmaspiegel von Glukagon detektiert werden (Ehrström M. et al. 2004).



**Abbildung 6:**  
**Rolle der Orexine für die Regulation der Glukosehomöostase.**

In der Aufrechterhaltung der Normoglykämie spielen mehrere miteinander verknüpfte Faktoren eine Rolle. Die Nahrungsaufnahme führt zur Hyperglykämie mit konsekutiver Hyperinsulinämie. Die Nahrungsaufnahme wird gehemmt. Durch Insulin kommt es beim Gesunden zur physiologischen Normalisierung des Blutzuckerspiegels. Glukagon und Insulin regulieren die Nahrungsaufnahme gegenseitig.

### 1.3 Forkhead-box-Proteine (FoxO)

Die Forkhead-box-Proteine bilden eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die in verschiedene Untergruppen (FoxA bis FoxR) unterteilt wird. Die FoxO-Subgruppe beinhaltet FoxO1, FoxO3a, FoxO4 und FoxO6. FoxO's haben unterschiedliche Aufgaben. Sie spielen in der Regulation der Angiogenese, der Bildung von Fett- und Muskelzellen und der Proliferation der pankreatischen B-Zellen eine Rolle (Gross DN. et al. 2008; Accili D. et al. 2004).

FoxO1 wurde ursprünglich aus Rhabdomyosarcom-Zellen kloniert und daher zunächst als FKHR (forkhead found in human rhabdomyosarcoma) bezeichnet (Gross DN. et al. 2008).

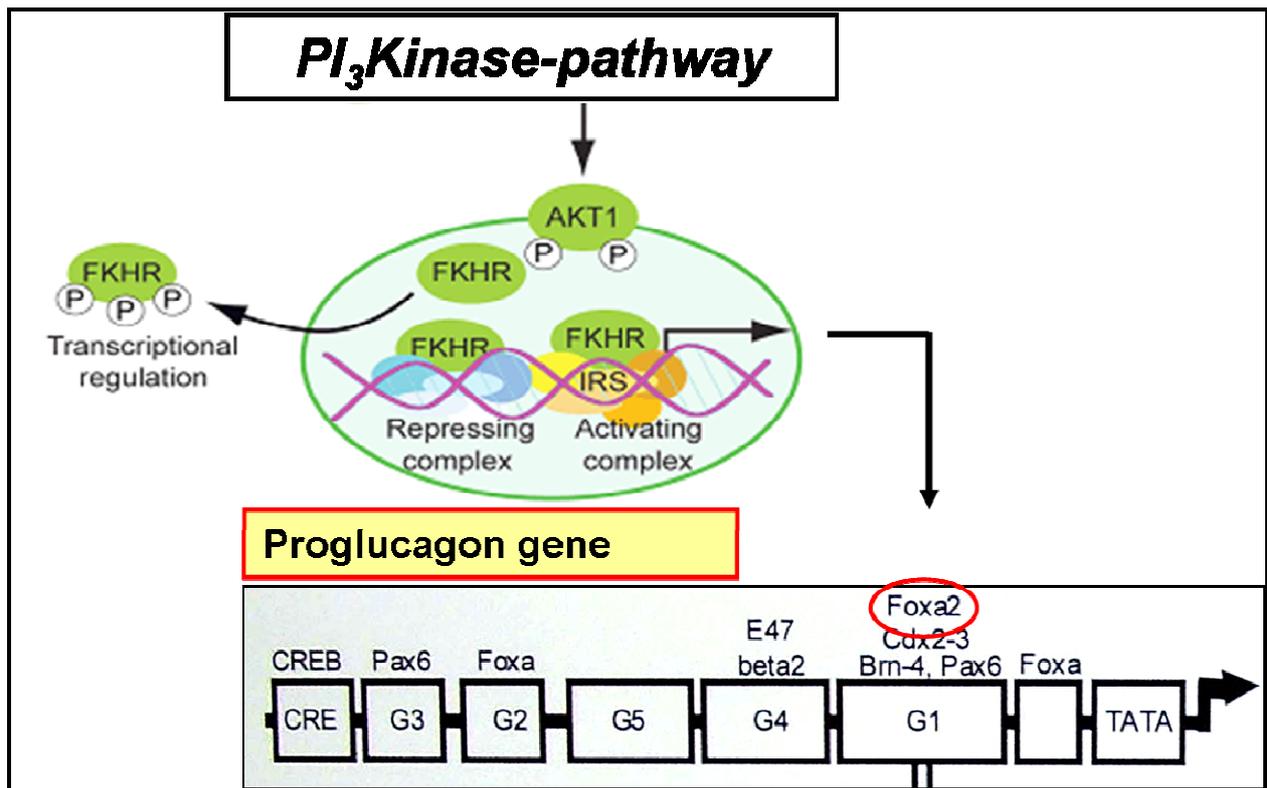
FoxO1 besitzt metabolische Schlüsselfunktionen bei der Insulin-gesteuerten Regulation der peripheren Utilisation von Glukose und dem hepatischen Glukose-Stoffwechsel (Accili D. et al. 2004). Heterozygot-defiziente FoxO1 Mäuse haben eine erhöhte Insulin-Sensitivität. Die Überexpression des FoxO1-Gens mit einhergehender konstitutiver

Aktivität induziert eine Hyperglykämie über die Modifizierung des hepatischen Glukosemetabolismus (Nakae J. et al. 2002).

McKinnon et al. haben im Rahmen von *in vitro* Untersuchungen FoxO1 Expression an pankreatischen A-Zellen nachgewiesen. Insulin führte zur nukleären Translokation dieses Proteins in den A-Zellen und zur Interaktion mit einer FoxO1-Bindungsstelle am Promotor des Proglukagon-Gens (McKinnon CM. et al. 2006). Diese Interaktion führt zur Hemmung der transkriptionellen Aktivität des Proglukagon-Gens.

In pankreatischen A-Zellen bindet FoxO1 in aktiver Form über Foxa2 an nukleären Promotorstellen (Enhancer-Regionen, die als G1 und G2 bezeichnet werden) des Proglukagon-Gens (siehe Abbildung 7). In dieser Konstellation wirkt FoxO1 als Repressor der Proglukagon-Gentranskription. FoxO1 wird über den Proteinkinase-B/Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase-1-(PKB=Akt1/PDK-1)-Signaltransduktionsweg phosphoryliert, was zu seiner Inaktivierung mit nachfolgender Translokation ins Zytoplasma führt.

Die metabolischen Effekte von FoxO1 scheinen vom Ernährungstand abhängig zu sein (Imae M. et al. 2003, Barthel A. et al. 2005). Bereits nach 48 Stunden Hungerzustand kommt es zu einer erhöhten FoxO1-mRNS-Expression in der Leber in Ratten. Nach erneuter Nahrungsaufnahme normalisiert sich die FoxO1 Expression (Imae M. et al. 2003). Unter proteinreicher, kohlenhydratarmer Diät werden diese Effekte nicht beobachtet. Diese Daten legen nahe, dass die metabolischen Effekte von FoxO1 von den Änderungen des Serum-Glukose-Spiegels und Ernährungszustands abhängig sind.



**Abbildung 7:**  
**Phosphatidylinositol-3-Kinase-abhängige Regulation des Proglukagonpromotors**  
 (modifiziert nach Leung-Theung-Long S. et al. 2005 und McKinnon CM. et al. 2006).

Über Aktivierung der PI3Kinase kommt es zur Phosphorylierung (Aktivierung) der AKT mit einhergehender Inaktivierung (Phosphorylierung) der FKHR. Dies führt zur zyttoplasmatischen Translokation des phosphorylierten FKHR. In unphosphorylierter Form ist FKHR stetig aktiv und bindet an Zielgene. Im Falle des Proglukagon-Promotors sind Foxa2 und Foxa Bindungsstellen für FoxO1.

Abkürzungen:

AKT1 = PKB = Proteinkinase B;

Bindungsstellen am Promotor des Proglukagon-Gens: Brn-4: brain 4; CDx2-3:homeobox Proteine;

CREB: cAMP response element-binding Protein; Foxa: forkhead-box-Protein Subgruppe A;

FKHR: FoxO1; IRS: Insulin-Rezeptor-Substrat; PAX6: paired box protein 6.

## 2 Zielsetzung

Die Serum-OXA-Konzentration ist vom Sättigungszustand, bzw. dem Serum-Glukose-Spiegel abhängig. Es existieren bereits Daten, die dafür sprechen, dass OXA die Sekretion von Glukagon *in vivo* beeinflusst (Nowak K.W. et al. 2005). Möglicherweise werden die A-Zellfunktionen durch OXA direkt reguliert. Ob es dabei lediglich zu einer erhöhten Freisetzung von Glukagon kommt oder einer *de novo* Glukagon-Neubildung ist bisher nicht bekannt. Eine Beteiligung von FoxO1, welches eine Rolle für die Regulation des Proglukagon-Gens spielt, ist denkbar.

Vor dem Hintergrund, dass OXA die Glukosekonzentration unabhängig von Insulin reguliert und Glukagon-Freisetzung *in vivo* beeinflusst, ergibt sich die Frage, ob OXA direkt mit den pankreatischen A-Zellen interagieren kann.

Folgende Aufgaben sollen im Rahmen der Dissertation bearbeitet werden:

- **Nachweis der OXR-Expression auf pankreatischen A-Zellen**
- **Charakterisierung der Effekte von OXA auf die Glukagon-Sekretion**
- **Untersuchung der Bedeutung von OXA für die Regulation der Proglukagon-Genexpression**
- **Charakterisierung von intrazellulären Mechanismen der OXA-abhängigen Regulation der Proglukagon-Genexpression**

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Geräte und Labormaterialien

<b>Gerät, Material</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav	Webeco, Selmsdorf
Co2- Inkubator Brutschrank	Labortect, Göttingen
Deckgläser (unbeschichtet)	Diamond Coatings, Halesowen,
Digitalkamera AxioCam HRc	Zeiss, Oberkochen
Elektrophorese Kammer	Bio-Rad, München
Fastblot Blotting Gerät	Biometra, Göttingen
Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Filterpapiere	Schleicher & Schuell, Dassel
Flüssig-Scintillationszähler 1409	Wallack, Freiburg
FluoView™ Confocal Mikroskop	Olympus, Hamburg
Gammazähler 1470 WIZARD Automatic	Wallac (Perkin Elmer), Rodgau
Gefrierschrank (-20°C sowie -85°C)	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
ICycler PCR-Gerät	Bio-Rad Hercules, CA,
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Kühlschrank (4-8°C) Profi line	Liebherr, Biberach an der Riss
Kühlzentrifuge Cryofuge 5000	Heraeus, Hanau
Laser Scanning Mikroskop – FV500	Olympus, Hamburg
Luminometer MicroLumat Plus LB 96V	Berthold Technologies, Bad
Magnetrührer IkaMag RCT	Ika, Staufen
Mikroskop Ck2	Olympus, Hamburg
Mikrozentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Mini-Protean® Tetra Electrophoresis System	Bio-Rad GmbH, München
Nitrozellulosemembran Trans-Blot Transfer	Bio-Rad GmbH, München
Multiwellplatten (6, 12, 24, 96)	Becton Dickinson, Heidelberg

Mikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Neubauer Zählkammer für Zellzahlbestimmung	Carl Roth, Karlsruhe
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
pH Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Reagenzgläser (12 x 75 mm)	Fisher Scientific, Schwerte
Röntgenfilm Cronex 5	Agfa HealthCare, Köln
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine Protec	Siemens AG, Erlangen
Semi Dry Blotter	Bio-Rad GmbH, München
Schüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Standzentrifuge Sigma 6K10	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sterilwerkbank/Bench Lamin Air HB 2448	Heraeus GmbH, Hanau
Zellkulturflaschen steril (75cm <sup>2</sup> , 175cm <sup>2</sup> )	Becton Dickinson, Heidelberg
Thermocycler TGradient	Biometra GmbH, Göttingen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vortexer Relax top	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellschaber 25cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
96 Well ELISA Mikroplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

### 3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

#### Chemikalien

10x Tris/Glycine/SDS Puffer  
30% Acrylamide-Mix  
4% Paraformaldehyd  
99,5% Ethanol  
6-Amino-hexansäure  
Albumin vom Rinderserum (BSA)

#### Hersteller

Bio-Rad GmbH, München  
Bio-Rad GmbH, München  
Herbeta, Berlin  
Carl Roth, Karlsruhe  
Carl Roth, Karlsruhe  
Sigma-Aldrich, Steinheim

Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-(+)-Glukose Lösung (45%)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (EtOH)	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (= FKS)	Gibco Invitrogen, Darmstadt
Formalin	Merck, Darmstadt
Glycerol und Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hepes 1M	Gibco Invitrogen, Darmstadt
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isobutylmethylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck, Darmstadt
Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad GmbH, München
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol (MeOH)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	Merck, Darmstadt
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)-Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Penicillin sowie Streptomycin	Gibco Invitrogen, Darmstadt
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim

Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad GmbH, München
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad GmbH, München
Tris-EDTA Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Trypan Blue Färbelösung 0,4%	Gibco Invitrogen, Darmstadt
Trypsin-EDTA	PAA GmbH, Pasching
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Molekularbiologisches Wasser	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 3.1.3 Lösungen und Puffer

Der Basis-Puffer für die Messung der Sekretion von Glukagon wurde aus Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer mit Zugabe von BSA (2mg/ml) hergestellt.

Der Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer wurde aus folgenden, in destilliertem Wasser aufgelösten Salzen hergestellt (die Mengenangaben beziehen sich auf 1 Liter Gesamtvolumen gelöst in destilliertem Wasser):

2 M	NaCl	(Molekulargewicht: 58.44)
1 M	KCl	(Molekulargewicht: 74.5)
100 mM	CaCl <sub>2</sub>	(Molekulargewicht: 147.0)
20 mM	MgSO <sub>4</sub>	(Molekulargewicht: 246.5)
1 M	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Molekulargewicht: 136.09)
1 M	NaHCO <sub>3</sub>	(Molekulargewicht: 83.995)
1 M	Hepes	

Die 10-fach konzentrierte Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) enthielt folgende Substanzen (die Mengenangaben beziehen sich auf 1 Liter Gesamtvolumen, gelöst in destilliertem Wasser):

80,0 g	NaCl	(Molekulargewicht: 58.44)
2,0 g	KCl	(Molekulargewicht: 74.5)
2,0 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(Molekulargewicht: 136.09)
14,0 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	(Molekulargewicht: 141.95)

Die PBS-Tween Lösung enthielt auf 1 Liter Gesamtvolumen 900 ml destilliertes Wasser, 98 ml 10x PBS und 2 ml Tween.

Protein Lyse-Puffer wurde aus folgenden Bestandteilen erstellt.

25 mM	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl; pH 6,8),
1,25 %	Mercaptoethanol,
1 %	Sodium-dodecyl-sulphate (SDS),
5 %	Glycerol,
0,0125 %	Bromphenolblau und Protease-Inhibitor-Cocktail (5-10 µl) der Firma Roche (Mannheim).

Das Trenngel für die SDS-Page wurde nach folgender Rezeptur zusammengestellt und in Form gegossen.

2600 µl	destilliertes Wasser,
670µl	Glycerin,
4000µl	30% Acrylamide Mix,
2500 µl	1,5M Tris Puffer (pH 8,8),
100µl	10% SDS,
100µl	10% Ammoniumpersulfat,
4µl	TEMED.

Das Sammelgel wurde nach dem gleichen Prinzip wie das Trenngel zusammengestellt und auf das Trenngel im selben Gefäß in Form gegossen.

3400 µl	destilliertes Wasser,
830µl	30% Acrylamide Mix,
630 µl	1,0M Tris Puffer (pH 6,8),
50µl	10% SDS,
50µl	10% Ammoniumpersulfat,
5µl	TEMED.

Das diskontinuierliche Puffersystem für einen halbtrockenen Proteintransfer bestand aus 3 Pufferlösungen, Anionenpuffer (A I, A II) und Kationenpuffer. Die Mengenangaben beziehen sich auf je 1 Liter Pufferlösung, aufgelöst in destilliertem Wasser:

A I	0,3 M	TRIS Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (M= 121,14 g/mol)
	20%	MeOH
A II	0,025 M	TRIS
	20%	MeOH
K	0,04 M	6-Aminohexansäure
	20%	MeOH

Der 10-fach konzentrierte Kathodenpuffer (Laufpuffer) für SDS-Page wurde aus folgenden Substanzen hergestellt (die Mengenangaben beziehen sich auf 1 Liter Pufferlösung, verdünnt in destilliertem Wasser):

250 mM	TRIS
1,9 M	Glycin
1 %	SDS

### 3.1.4 Antikörper

**Tabelle 1: Beschreibung der Antikörper**

Material	Species/ Wirt	Hersteller	Verdünnung
OX1R-Antikörper und blockierendes Peptid	Ziege	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)	1: 50; 1:100
Cyanine-3-(Cy3)-konjugierte sekundäre Antikörper (Anti-Ziege)	Maus/Affe	Dianova GmbH (Hamburg, Deutschland)	1:400

Antikörper gegen ges. AKT (= PKB), phosphoryliertes AKT (pAKT, Ser 473/Th 308) total PDK-1, phosphoryliertes PDK-1 (pPDK-1, Ser 241) FoxO1, phosphoryliertes FoxO1 (pFoxO1, Ser 256)	Hase	Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)	1:1000
Horseradish-peroxidase-(HRP)-gekoppelter sekundärer Antikörper (Anti-Hase)	Ziege	Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)	1:1000

### 3.1.5 Oligonukleotide und Sonden

In Tabelle 2 sind die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide und Sonden für Proglukagon, Proinsulin und  $\beta$ -Actin aufgelistet. Hersteller: TibmolBiol (Berlin).

**Tabelle 2: Oligonucleotide und Sonden**

Primer	Sense	Anti-sense
Proglukagon	GGATGTTGATAAGATAACAACCTTCACGA	CAGAAGAATAATCTCGCTGCTACAC
$\beta$ -actin	TGCTGACCGGATGCAGAA	TCAGGAGGAGCAATGATCTTGA
Proinsulin	TGTGGGGAACGTGGTTTCTT	GGTGCAGCACTGATCCACAAT
	GTGGGGAACGTGGTTTCTTCTAC	CTGATCCACAATGCCACGC
Sonden	Markierte Sonde	
Proglukagon	6FAM-AAACAGGGTGGGACCTTTAAAATGAGA	
Proinsulin	6FAM-ACCCAAGTCCCGTCGTGAAGTGGA--TMR	
$\beta$ -actin	6FAM-CACTGCTCTGGCTCCCAGCACCA XT--PH	

### 3.1.6 Reagenzien und Detektionsmethoden

**Tabelle 3: Reagenzien und Detektionsmethoden**

Material	Hersteller
OXA (lyophilisiertes Pulver)	NeoMPS (Strasbourg, Frankreich)
OXR1-Antikörper blockierendes Peptid (sc-98061)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
PI3K-Inhibitor (LY294002)	Calbiochem (San Diego, CA, USA)
Glukagon -Radioimmunoassay (RIA) (DPC KGND1)	DPC Biermann (Bad Nauheim,

	Deutschland)
Insulin-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Ratte	Alpco Diagnostics (Windham, NH)
cAMP Biotrak Enzyme Immunoassay (EIA) System, RPN 225 96 wells	Amersham Biosciences Europe GmbH, (Freiburg, Deutschland)
Amersham ECL (hochsensitives) Reagenz-System für die chemilumineszente Western Blot Detektion	Amersham Biosciences Europe GmbH, (Freiburg, Deutschland)
TaqMan Master-Mix (Applied Biosystems)	Life Technologies Corporation (Carlsbad, California)
LightCycler® TaqMan® Master	Roche (Mannheim, Deutschland)
RNeasy® Mini Kit sowie RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche (Mannheim, Deutschland)
Reverse Transkriptase (RT) und SuperScript II	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

## 3.2 Zellen

### 3.2.1 Glukagon - und Insulin-produzierende Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden von der ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland) bezogen:

- **InR1-G9-Zellen:** Glukagon-produzierende monoklonale pankreatische A-Zelllinie (Hamster).
- **INS-1-Zellen:** Insulin-produzierende monoklonale pankreatische B-Zelllinie (Ratte).
- **CHO-K1-Zellen:** (chinese hamster ovary cells) ovariale Fibroblasten-Zelllinie des chinesischen Hamsters. Diese Zellen sind den menschlichen sehr ähnlich mit hoher biologischer Stabilität und Widerstand. Als Besonderheit exprimieren diese Zellen keine G-Protein gekoppelte Rezeptoren.

Zu Anfang werden die tiefgefrorenen zellhaltigen Röhrchen schnell aufgetaut. Der Inhalt wird tropfenweise in ein mit 10 ml 20% FKS-haltigem Kulturmedium gefülltes Reagenzgefäß gegeben. Das Gemisch wird zentrifugiert (800 U/min bei 25°C für 5 Minuten) und das Pellet in 20 ml Zellkulturmedium aufgenommen.

Die Zellen werden in RPMI-(Roswell Park Memorial Institute)-1640 Medium bei 37,0 °C Temperatur in wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) kultiviert. Um ein optimales Wachstum zu erzielen, wird das Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und L-Glutamin angereichert. Zur Verhinderung einer Infektion erfolgt die antibiotische Prophylaxe mittels Zugabe an Streptomycin (100µg/ml) und Penicillin (50µg/ml) zum Kulturmedium. Das Zellwachstum wird täglich visuell mikroskopisch kontrolliert. Um ein konfluentes Wachstum zu verhindern, werden die Zellen zweimal pro Woche mittels Trypsin-EDTA 1:5 - 1:2 geteilt. Die Ernährung der Zellen wird durch zweitägigen Wechsel des Kulturmediums gewährleistet. Bei Mediumwechsel erfolgt immer ein Waschgang mittels PBS. Alle Reagenzien werden beim Ansetzen steril filtriert und vor Verwendung auf 37°C aufgewärmt.

Um Zellen für spätere Verwendung zu konservieren werden Chargen in 5% DMSO- und 20% FKS-haltigem Kulturmedium bei -80°C eingefroren.

Für die einzelnen Versuche werden die Zellen in 6-, 24-, oder 96-Wellplatten ausplattiert. Hierfür werden die Zellen nach Entfernung des Kulturmediums mit PBS gewaschen, mittels Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturflasche gelöst und in Kulturmedium in eine Falcontube überfüllt. Nach Abzentrifugieren wird der neu gewonnene Zellpellet in 10 ml Kulturmedium aufgelöst.

Die Zellzahlbestimmung erfolgt mittels Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop. Hierfür werden 100 µl des zellhaltigen Kulturmediums mit 100µl Trypanblau angefärbt und hiervon 10 µl in die Zählkammer gefüllt. Der Zellzahl werden unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung in 4 x 4 Quadranten der Neubauer-Zählkammer gezählt und der Durchschnittwert ermittelt. Die Gesamtzellzahl wird durch Hochrechnung der Verdünnung entsprechend bestimmt.

Die Vitalität der Zellen wird durch Färbung mit Trypanblau (färbt nur tote Zellen) kontrolliert.

## 3.3 Methoden

### 3.3.1 Bestimmung der Glukagon- und Insulinsekretion

#### 3.3.1.1 Messung der Produktion von Glukagon in InR1-G9-Zellen

InR1-G9-Zellen werden in 24-Well-Platten ausgesät ( $0,2 \times 10^5$  Zellen/Well) und für drei Tage unter angegebenen Versuchsbedingungen (siehe Kapitel 3.2) kultiviert um eine optimale Haftung sowie eine ausreichende Zelldichte zu erzielen. Vor Beginn der Untersuchung werden die Zellen für zwölf Stunden in Kulturmedium ohne FKS inkubiert. Am Folgetag wird das Medium abgesaugt. Die Zellen werden mit PBS gewaschen. Es erfolgt zunächst eine 30-minütige Vorbehandlung der Zellen mit einer im Basis-Puffer angesetzten 2 mM Glukose-haltigen Lösung. Nachfolgend erfolgt die Inkubation mit einer in Basis-Puffer angesetzten L-Arginin (20mM)-, IBMX (0,5M)-haltigen Lösung. Dieser Lösung werden unterschiedliche Mengen von OXA (Endkonzentrationen: 1  $\mu$ M bis 1 pM) zugesetzt. Die Zellen werden für verschiedene Zeiten mit den genannten Lösungen inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wird das Inkubationsmedium in neue Eppendorf-Röhrchen abgezogen und nachfolgend abzentrifugiert (10 Minuten bei 8000 RPM). Die so gewonnenen, gereinigten Überstände werden bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

Die Glukagonkonzentrationsbestimmung erfolgt mittels eines Radioimmunoassay (DPC KGND1, DPC Biermann, Limeshain) nach Angaben des Herstellers. Kurz zusammengefasst werden das Glukagon-Antiserum (Wirt: Hase),  $\text{I}^{125}$  markiertes synthetisches Glukagon, sowie Glukagon-Standard-A Lösungen in je 10 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Das präzipitierende Reagenz wird in 1 ml der Glukagon-Standard F in 2 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Die Reagenzien werden frisch, 30 Minuten vor Gebrauch, zubereitet. Die in Lösung gebrachten Antikörper werden im Kühlschrank gelagert. Die Standardreihe wird nach Angaben des Herstellers verdünnt. Zur Detektion werden die Ansätze in Glasröhrchen in zweifacher Ausfertigung zubereitet. Die Proben werden für je 24 Stunden bei  $4^\circ\text{C}$  sowohl nach Zugabe des Antiserums (100  $\mu$ l pro Probe) als auch nach Zugabe des radioaktiv markierten Glukagons inkubiert. Zur Präzipitation wird pro Röhrchen 1000  $\mu$ l kaltes präzipitierendes Reagenz zugefügt und 15 Minuten lang abzentrifugiert (1500 x g). Die Reagenzgläser werden dekantiert und die Radioaktivität (cpm) von Glukagon wird gemessen.

### **3.3.1.2 Messung der Produktion von Insulin in INS-1-Zellen**

INS-1-Zellen werden in 24-Well-Platten ausgesät ( $2,5 \times 10^5$  Zellen/Well) und für drei Tage unter den üblichen Konditionen (siehe Kapitel 3.2) kultiviert. Bei diesen Experimenten werden die Inkubationslösungen auf der Basis von Krebs-Ringer-Bikarbonat-(KRB)-Puffer zubereitet. Sie enthalten darüber hinaus 0,5 % Gew./Vol. BSA.

Am dritten Tag werden die Zellen nach Abzug des Kulturmediums und Waschgang mit PBS für 30 Minuten lang mit 3 mM Glukose-haltigem KRB-Puffer vorinkubiert.

Danach werden die Zellen mit PBS gewaschen. Hiernach erfolgt die Inkubation mit OXA-haltigem KRB-BSA-Puffer mit Zugabe von 3 mM Glukose. Am Ende der Inkubation wird der Überstand in ein Gefäß abgezogen und abzentrifugiert (8000 RPM, 10 Minuten). Als Kontrolle werden Zellen mitgeführt, die mit 10 mM Glukose-haltigem KRB-Puffer behandelt wurden. Die Überstände werden erneut abgezogen und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Die Bestimmung der Insulin-Konzentration erfolgt mittels ELISA nach den Angaben des Herstellers. Kurz zusammengefasst werden die Reagenzien für die Messung in einer 96-Well Elisa-Platte (Bestandteil des Insulin-Elisa-Sets) zusammengeführt. Gemäß mitgeliefertem Schema werden entweder Standard, Kontrolle oder die zu messende Probe (25  $\mu\text{l}$  pro Well) pipettiert. Je Well werden 100  $\mu\text{l}$  Antikörper zugefügt, die Platte abgedeckt und bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wird die Platte dekantiert und die Wellen sechsmal mit dem im Set beigefügten Waschpuffer gewaschen. Als nächster Schritt werden 100  $\mu\text{l}$  Enzym-Substrat (TMB-Lösung) pro Well zugegeben und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe der ebenfalls beigefügten Säure (Stop-Lösung, 100  $\mu\text{l}$  pro Well) gestoppt. Die Reaktionsprodukte werden durch eine spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der optischen Dichte bei  $\lambda = 450\text{ nm}$  erfasst.

### **3.3.2 Proteinisolierung**

Vor Beginn der Stimulation werden die Zellen in Petrischalen für 24 Stunden in Serum-freiem Medium inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt ein ausgiebiger Waschgang mit PBS.

Um die vollständige Lyse der Zellen zu erzielen, werden die Zellen zuerst mechanisch vom Boden der Petrischalen mittels eines sterilen Schabers abgeschabt und in eiskalten Lyse-Puffer gegeben. Die hiernach gewonnenen Lysaten werden zunächst bei 95°C für 2 Minuten bei 500 RPM inkubiert. Nach Abzentrifugieren wird der Überstand abpipettiert und danach bei -80°C eingefroren zur Verwendung für weitere Experimente.

### **3.3.3 Detektion der Proteine**

#### **3.3.3.1 Western Blot**

Das Trenngel und das Sammelgel werden bereits am Vortag gegossen. Das Blotting-Gerät (Mini-Protean® Tetra Electrophoresis System, Bio-Rad GmbH, München) wird nach Angaben des Herstellers zusammengesetzt, und mit Laufpuffer aufgefüllt. In die Taschen des Sammelgels werden pro Well 10 µl mit Laemli-Sample-Puffer markierte Proteinlysate aufgetragen. In die erste Tasche wird Protein-Standard zugefügt um die Proteine nach Gewicht identifizieren zu können. Die Kammer wird mit Kathodenpuffer aufgefüllt. Die Proben werden bei 80V für ca.10 Minuten zunächst nach Molekulargewicht aufgetrennt. Die weitere Auftrennung erfolgt dann bei 150-200 V für max. 90 Minuten unter visueller Kontrolle des Proteinlaufes. Die Kammer wird vorsichtig auseinandergebaut und die Gele werden in einen „K-Puffer“ gelegt. Mehrere Lagen Filterpapier und die Membran werden auf Maß geschnitten. Die Filterlagen werden mit A I- oder A II-Puffern befeuchtet, die Membran nur mit A II-Puffer befeuchtet. Als nächster Schritt wird das Blotting-Sandwich zusammengestellt aus 2 A I-Filterlagen, 1 A II-Filterlage und einer Membran. Unter Schutz eines Schwammes werden die störenden Luftbläschen entfernt. Die Übertragung der Proteine erfolgt im Blotting-Gerät 90 Minuten lang (3mA/cm<sup>2</sup>). Am Ende wird das Blot vorsichtig auseinandergebaut und die Membranen mit PBS gewaschen. Um den Proteingehalt zu bestimmen, erfolgt die Visualisierung der Proteine mittels Ponceau-S Lösung. Um die unspezifische Bindung zu blockieren werden die Membranen mit einer 5 %-igen Milchpulver-Lösung (gelöst in PBS, versetzt mit 0,2 % Tween-20 (PBS-T) 30 Minuten lang blockiert. Nach einem kurzen Waschgang mit PBS erfolgt die Inkubation mit dem gewünschten primären Antikörper über Nacht bei 4 °C. Die Antikörper werden ebenfalls in einer Milchpulverhaltigen Blockierungslösung aufgelöst.

Zur Prüfung der Spezifität des Primärantikörpers wird eine Membran, auf der sich die gleichen Proteine befinden, mit dem Primär-Antikörper und speziellen Blockierungspeptid inkubiert. Am Folgetag werden die Membranen mit PBS-T ausgiebig gewaschen. Danach erfolgt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 90 Minuten bei Raumtemperatur. Die Antikörper-Bindung wird mit dem ECL-Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) auf einem lichtempfindlichen Film visualisiert.

Sowohl die Proteinlysate aus der Ratten-Hypophyse; Ratten- und Maus-Pankreas als auch fixierte Gewebe aus Ratten-Pankreas wurden mir von meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Strowski zur Verfügung gestellt.

### **3.3.3.2 Immunfluoreszenz**

Für diese Experimente werden die zu untersuchenden Zellen unter den üblichen Konditionen auf Deckplättchen ausplattiert und bis zum Erreichen einer 80 %-igen Zelldichte inkubiert. Zur Fixation werden die Platten für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit einer 4 %-igen, gepufferten Paraformaldehyd-Lösung behandelt und danach mit PBS gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindung zu minimieren erfolgt dann eine 30-minütige Inkubation in einer 2 %-igen Milchpulver-Lösung. Die Zellen werden über Nacht mit dem primären Antikörper bei 4 °C inkubiert. Die Antikörper werden in 0,5% Gew./Vol. BSA-haltigen PBS-Lösung verdünnt. Pro Platte werden 150 µl Antikörper aufgetropft. Am Folgetag werden die Platten ausgiebig mit PBS gewaschen. Um die Antikörper-Bindung zu visualisieren, werden die Zellen mit Cy3-markierten, sekundären Antikörpern auf Raumtemperatur für 45 Minuten behandelt. Nach mehrfachem, kurzzeitigem Waschen mit PBS und dann mit destilliertem Wasser erfolgt anschließend die Fixierung mit 96 % Ethanol für 3 Minuten. Die Platten werden mit Evanol luftdicht abgedeckt. Die Aufnahmen erfolgt in einer Dunkelkammer mittels eines Immunfluoreszenz-Mikroskops (Axioskop, Carl Zeiss Inc., Jena).

Die bereits fixierte humane Pankreas-Gewebeproben wurden von Herrn Dr. Carsten Grötzinger (Forschungslabore der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie der Charité, Campus Virchow-Klinikum, Klinikdirektor: Herr Prof. Dr. B. Wiedenmann) zur Verfügung gestellt.

### **3.3.4 RNS-Isolierung**

Die zu untersuchenden Zellen werden in 6-Well-Platten ausgesät und unter den üblichen Bedingungen (siehe Kap. 3.2) kultiviert. Am Folgetag werden die Zellen mit PBS gewaschen und das Kulturmedium durch FKS-freies Medium ersetzt. Dem Medium werden 2 mM Glukose und OXA (1  $\mu$ M bis 1 pM). Um weitere Untersuchungen bezüglich der vermittelten Signaltransduktionsweg vornehmen zu können, wird in einem zusätzlichen Ansatz PI3K-Inhibitor (LY294002) zum Inkubationsgemisch dazugegeben. Das Gesamtvolumen beträgt 1 ml pro Well. Die Überstände werden nach den festgelegten Inkubationszeiten abgezogen. Die Isolierung der mRNA erfolgt mittels des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers. Um DNS-Kontaminationen zu vermeiden bzw. zu verringern, werden die Ansätze mit dem RNase-freien DNase Set (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers behandelt. Die Menge der gewonnenen RNS wird durch eine spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der optischen Dichte bei  $\lambda = 260$  nm ( $OD_{260}$ ) erfasst.

### **3.3.5 Quantitative mRNA-Bestimmung**

Die gewonnene RNS wird mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT) SuperScript II (Invitrogen, Karlsruhe) unter Verwendung von Oligo-dT-Primern in komplementäre DNS (cDNS) umgeschrieben. Die quantitative Bestimmung der cDNS -Menge erfolgt mittels quantitativer Echtzeit-PCR (quantitative real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) mit einem ICycler PCR-Gerät der Firma BioRad (Hercules, CA, USA) unter Verwendung von FAM-TAMRA-Taqman-Sonden. Die verwendeten Sonden und Primer wurden bei TibmolBiol (Berlin) bestellt (Sequenzen siehe Tab. 2). Jeder Ansatz hat ein Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l und enthält 12,5  $\mu$ l TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Roche, Branchburg, New Jersey, USA), 0,75–1,0  $\mu$ l Primer (vorwärts als auch Revers) und 0,2–0,5  $\mu$ l FAM-markierte Sonde, 1  $\mu$ l cDNS und 9,8  $\mu$ l molekularbiologisches ultrareines Wasser. Als Standardreihe wird eine Verdünnungsserie (1:1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625, 1:3125) der cDNS mitgeführt. Die Proben werden im doppelten Ansatz in PCR-Platten pipettiert.

Die PCR verläuft in 36 Zyklen, mit einer Startphase von 10 Minuten bei 98°C. Die Multiplikation der cDNS erfolgt durch Wiederholung dreier Schritte: die Denaturierung

der cDNS bei 95°C für 20 Sekunden, die Hybridisierung der Primer an cDNS-Ziel bei 60°C für 15 Sekunden, und die Bildung der komplementären DNS durch Polymerasen bei 72°C für 15 Sekunden. Die Fluoreszenz-markierte Sonde hybridisiert mit der Ziel-cDNS. Das gemessene Fluoreszenz-Signal entsteht durch den Abbau durch die DNS-Polymerasen.

Zur Quantifizierung der cDNS-Menge erfolgt nach dem Ct-Wert (cycle threshold, Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz die angegebene Masse übersteigt). Die Messwerte werden auf die Expressionslevel der mitgeführten  $\beta$ -Actin-RNS normalisiert.  $\beta$ -Actin ist ein sogenanntes (engl.) *housekeeping*-Gen, welches konstitutiv in gleich bleibender Menge exprimiert wird und dessen Transkription nicht reguliert wird. Als negative Kontrollen werden Ansätze ohne reverse Transkriptase oder ohne cDNS mitgeführt.

### **3.3.6 Experimentelle Suppression der FoxO1 mRNA- Expression**

Suppression der mRNA Expression wird mittels siRNA (small-interfering Ribonukleinsäure) Technik erzielt. Ausgewählte siRNA-Moleküle binden mit hoher Spezifität an komplementäre mRNA-Sequenzen mit der Folge, dass möglichst wenig Protein mehr gebildet wird. Die verwendeten siRNA-Moleküle sind klein, was methodisch eine Transfektion der Zellen erleichtert.

Zur Synthese der FoxO1-siRNA wurde das „Gene Globe design Tool“ der Firma Qiagen verwendet. Die Transfektion der Zellen erfolgt mittels des HiPerFect Reagenz-Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Kurz zusammengefasst wird die lyophilisierte siRNA mittels eines mitgeschickten Lösungspuffers auf 250  $\mu$ l Gesamtvolumen verdünnt und bei 90°C für 1 Minute aktiviert. Um die während der Lyophilisierung geformten Aggregate abzubauen erfolgte ein zweiter Inkubationsschritt bei 37°C für 60 Minuten. Für den Versuch werden die Zellen in 6-Well-Platten (2,5 x 10<sup>5</sup> pro Well) ausgesät und 3 Tage lang bis zum Erreichen einer 80%-igen Zelldichte wachsen gelassen. Am Tag des Versuchs werden die Zellen mit PBS gewaschen und das Kulturmedium auf ein FKS- und Antibiotika-freies Kulturmedium gewechselt.

Die 3 Hauptlösungen zur Transfektion werden in Kulturmedium ohne FKS und ohne Zugabe von Antibiotika angefertigt. Die Kontrolle enthält das Transfektionsreagenz ohne siRNA (100  $\mu$ l Kulturmedium + 10  $\mu$ l HiPerFect Reagenz pro Well), die

Transfektionslösung enthält zusätzlich 0,6 µl aus einer Stammlösung mit 20 µM FoxO1 siRNS (Endkonzentration 5 nM) pro Well; für die Transfektionskontrolle wird eine so genannte GFP siRNS zugegeben (5 nM Endkonzentration). Die gefertigten Lösungen (Kontrolle, Transfektionslösung, Transfektionskontrolle) werden in je einem zweifachen Ansatz zu dem Medium vorsichtig, tropfenweise zugegeben. Die Zellen werden für mindestens 6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Hiernach werden die Zellen gewaschen und erneut mit dem üblichen Kulturmedium über Nacht ruhen gelassen. Am nächsten Tag erfolgt die erneute Inkubation mit OXA in FKS-freiem Kulturmedium.

Die Effekte der Suppression der FoxO1-mRNS werden mittels qRT-PCR (siehe Kap. 3.3.6) und Western Blot Analyse (siehe Kap. 3.3.3.1) objektiviert.

### **3.3.7 Messung der intrazellulären cAMP-Akkumulation**

Die Zellen werden in 96-Well-Platten ausgesät und unter üblichen Bedingungen inkubiert (siehe Kap. 3.2). Nach Erreichen einer Zelldichte von ca. 80 % pro Well werden die Zellen über Nacht in FKS-freiem Medium belassen.

Die cAMP-Bestimmung erfolgt mit einem Enzymimmunoassay (cAMP Biotrak EIA System; Amersham Biosciences, Freiburg) nach Anleitung des Herstellers.

Das Assay-Puffer-Konzentrat wird auf 500 ml Gesamtvolumen mittels destillierten Wassers verdünnt. Alle weiteren Assay-Reagenzien (Lyse-Reagenz 1A, 1B, 2A, 2B) werden mit dem Assay-Puffer auf das geforderte Endvolumen aufgelöst. Das Lyse-Reagenz 1A beinhaltet 2.5% Dodecyltrimethylammonium Bromid, das Lyse-Reagenz 1B 0.25% Dodecyltrimethylammonium-bromid. Für die Standard-Reihe werden 32 pmol/ml cAMP mit 2 ml Assay-Puffer in Lösung gebracht und seriell verdünnt. Das Antiserum (anti-cAMP) und cAMP-Peroxidase Konjugat (beinhaltet cAMP-horseradisch Peroxidase) wird je in 11 ml Assay-Puffer aufgelöst. Der Waschpuffer wird mit destilliertem Wasser auf 500 ml Endvolumen verdünnt.

Das Zellmedium für die Assays besteht aus Serum-freiem Kulturmedium mit 1% Gew./Vol. BSA. Die Zellen werden zunächst mit PBS gewaschen. Danach wird 0,5 M IBMX (Hemmstoff der cAMP-Phosphodiesterase (cAMP-PDE) zum Medium zugegeben. Die Zellen werden für 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C vorinkubiert. Nach erneutem

Waschgang mit PBS werden die Zellen mit OXA, gelöst im Inkubationsmedium ebenfalls im Brutschrank inkubiert. Zuletzt werden 1  $\mu\text{M}$  Forskolin in jedes Well zugegeben und die Zellen weitere 5 Minuten inkubiert. Danach werden die Zellen mit PBS gewaschen und lysiert mit einem Lyse-Puffer des Herstellers. Die mitgelieferte 96-Well-Assay-Platte wird nach vorgegeben Schema mit Standard sowie Zelllysaten befüllt und Antiserum (100  $\mu\text{l}$ /Well) zugegeben. Es erfolgt eine Inkubation von 2 Stunden bei 3-5°C. Als nächstes werden 50  $\mu\text{l}$  cAMP-Peroxidase pro Well zugegeben und für 60 Minuten bei 3-5°C inkubiert. Hiernach wird die Platte dekantiert, die Wells vorsichtig, mehrmals mit dem mitgelieferten Waschpuffer gewaschen und am Ende abgetupft. Pro Well werden 150  $\mu\text{l}$  des mitgelieferten Enzym-Substrats (TMB-Lösung) zugegeben und die Platte für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wird mittels einer Schwefelsäure gestoppt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt durch Messung der optischen Dichte bei  $\lambda = 450 \text{ nm}$ .

### **3.4 Statistik**

Zur statistischen Auswertung fand die GraphPad Prism Software (Version 4.0 La Jolla, CA, USA) Anwendung. Die Daten wurden als Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD) dargestellt. Als signifikante Unterschiede wurden Werte mit einem  $p < 0,05$  festgelegt, errechnet mittels Student's t-Test. Zur quantitativen Berechnung der cDNS-Mengen im Rahmen der Echtzeit-PCR wurde der LightCycler® Software Version 4.5 (Roche, Mannheim) verwendet.

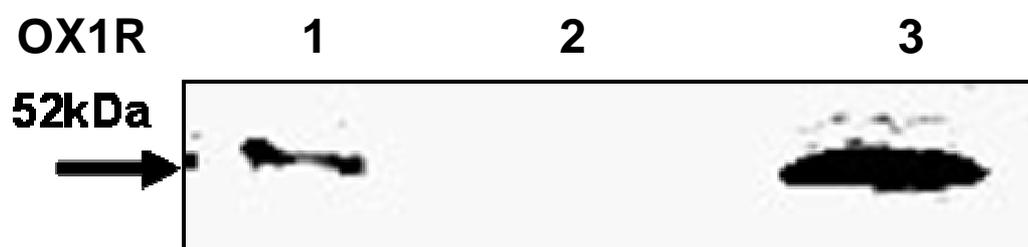
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Expression von Orexin-Rezeptoren

Als Grundlage für weiterführende Experimente habe ich zunächst die Expression von OX1R auf pankreatischen A-Zellen untersucht. Da einige Experimente auch an Geweben durchgeführt wurden, habe ich vergleichend auch die OX1R Expression auf pankreatischen B-Zellen charakterisiert. Die Untersuchungen wurden sowohl in isolierten pankreatischen Inselzellen der Maus und Ratte (siehe Abb. 8), als auch in zwei monoklonalen pankreatischen A- und B-Zelllinien (InR1-G9-Zellen und INS-1-Zellen, siehe Abb. 9) durchgeführt. OX1R Protein habe ich mittels Western Blot und Immunofluoreszenz detektiert.

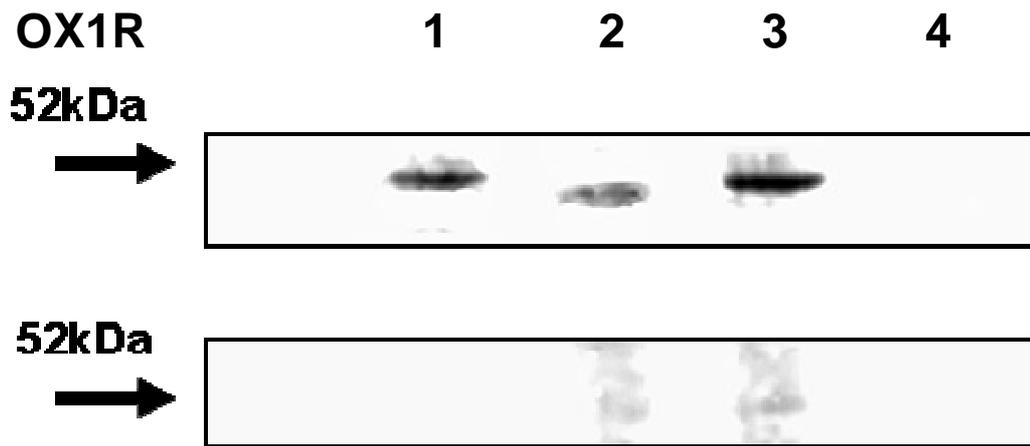
OX1R-Immunoreaktivität konnte sowohl in isolierten pankreatischen Inselzellen der Maus als auch der Ratte detektiert werden (siehe Abb. 8). Sowohl die Glukagon-sezernierende InR1-G9 Zelllinie als auch die Insulin-sezernierende INS-1 Zelllinie exprimieren OX1R-Protein (siehe Abb. 9, Proteinsignal von einem Molekulargewicht von 52 kDa). Im Gegensatz dazu konnte erwartungsgemäß kein OX1R-Protein auf CHO-K1 Zellen (Negativkontrolle, siehe Abb. 9) nachgewiesen werden.

Die Spezifität der Antikörperbindung wurde mittels Anwendung eines Blockierungs-Peptids gegen OX1R geprüft (siehe Abb. 9 untere Box).



**Abbildung 8: Proteinnachweis des OX1R auf pankreatischen Inselzellen.**

Nachweis von OX1R (Signal von 52 kDa Molekulargewicht) auf isolierten pankreatischen Inselzellen der Ratte (1) und der Maus (3) mittels Western Blot. Als negative Kontrolle (2) dienten Proteinlysaten isoliert aus CHO-K1-Zellen.



**Abbildung 9: Proteinnachweis des OXR1 auf pankreatischen A- und B-Zellen.**

Detektion von OX1R in Proteinlysaten gewonnen aus InR1-G9-Zellen (2) und INS-1-Zellen (3) mittels Western Blot. Als positive Kontrolle diente Proteinextrakt gewonnen aus der Hypophyse von Ratten (1), als negative Kontrolle Proteinlysate gewonnen aus CHO-K1 Zellen (4). Die Spezifität der Antikörperbindung wurde mit einem blockierenden Peptid gegen OX1R validiert (unterer Western Blot).

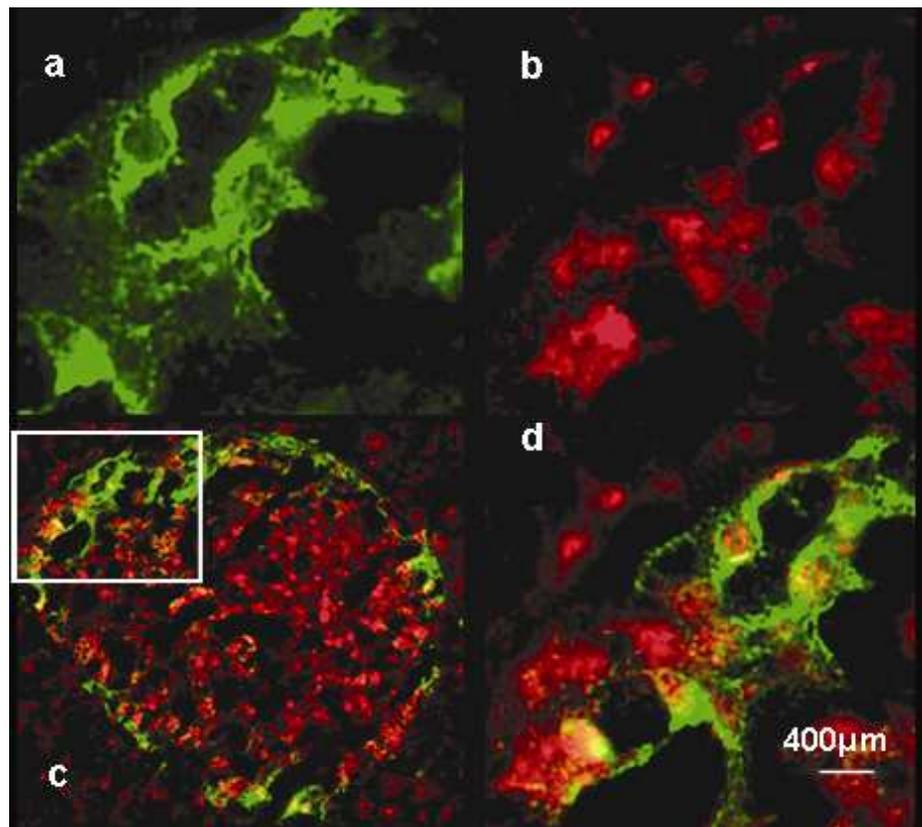
Um die zelluläre Lokalisation des Rezeptors in Inseln zu charakterisieren, habe ich immunhistochemische Untersuchungen mittels Fluoreszenz-markierter Antikörpern an isolierten Pankreasinseln der Ratte durchgeführt (siehe Abb. 10).

Die Glukagon-immunoreaktiven Zellen (A-Zellen) habe ich erwartungsgemäß in der Peripherie der Langerhans-Inseln detektiert (grüne Signalfarbe Abb. 10 A a, c, d). Interessanterweise lagen die OX1R-positiven Zellen durchgehend auch im zentralen Anteil der Langerhans-Inseln (rote Signalfarbe Abb. 10 A b, c, d).

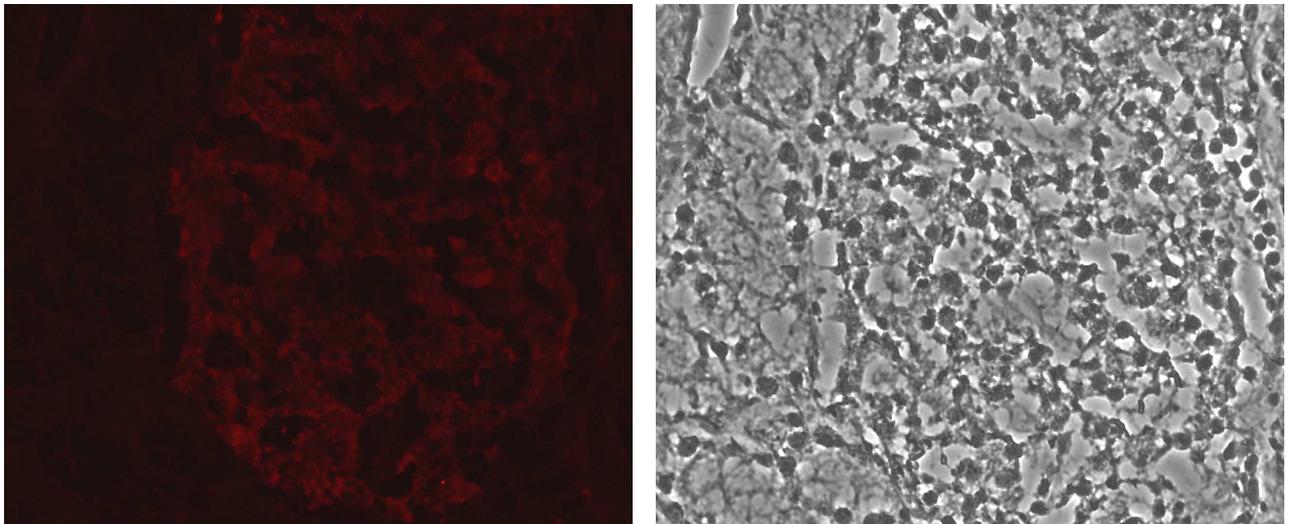
In der 400-fachen Vergrößerung ist die Ko-Lokalisation der Glukagon- und OX1R-positiven Signale vorwiegend im peripheren Anteil der Langerhans-Inseln (Abb. 10 A d) zu sehen.

Die mittels Western Blot nachgewiesene OX1R-Positivität in InR1-G9- und INS-1-Zellen (siehe Abb. 9) konnte auch immunzytochemisch bestätigt werden (siehe Abb. 11).

**A**



**B**



**Abbildung 10:**

**Immunhistochemische Detektion des OX1R auf Langerhans'schen Inseln des Ratten-Pankreas.**

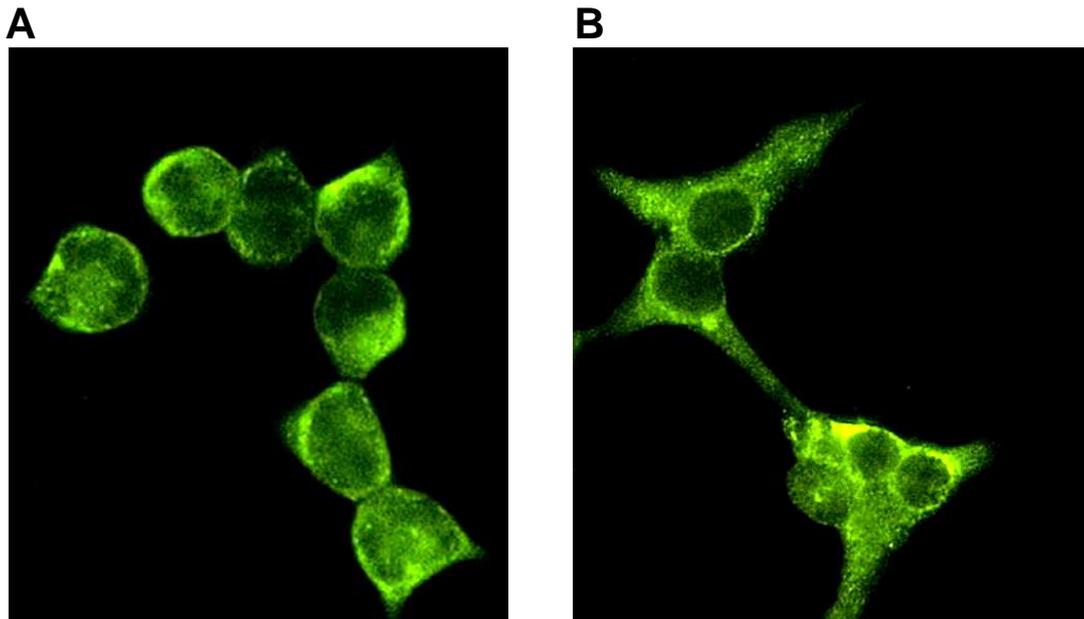
A) Immunzytochemische Färbung des Ratten-Pankreas mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpern:

a) Glukagon-spezifische Antikörper (grüne Signale) und

b) OX1R-spezifische Antikörper (rote Signale).

c)+ d) Ko-Expression von Glukagon- und OX1R. Die einzelnen Abschnitte zeigen die Signale detektiert bei verschiedenen Vergrößerungen (400x – 200x).

B) Kontrollen der Immunreaktion: Färbung mit dem sekundären Antikörper ohne Anwendung der Primärantikörper (links), Durchsichtsbild des fixierten Gewebes (rechts).



**Abbildung 11:**  
**Immunzytochemische Detektion des OX1R auf monoklonalen A- und B-Zelllinien.**

Immunzytochemische Färbung der A) InR1-G9-Zellen und B) INS-1-Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten OX1R-spezifischen Antikörper (400 x Vergrößerung).

## **4.2 Rolle von OXA für die Regulation des endokrinen Pankreas**

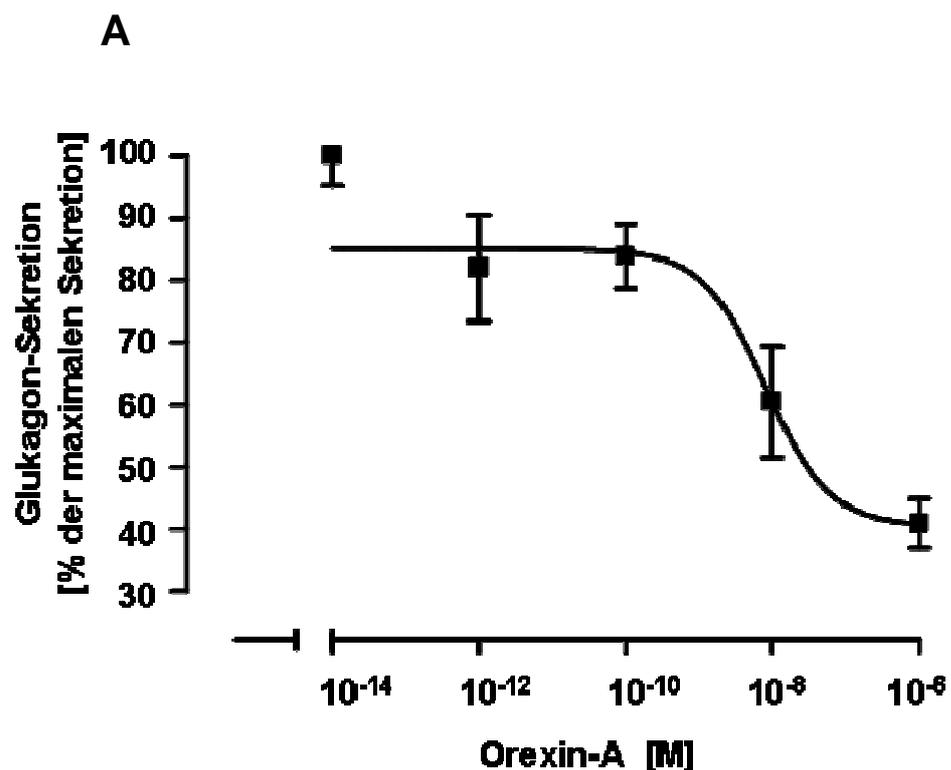
Zunächst habe ich den Einfluss von OXA auf die Freisetzung von Glukagon sowie Insulin in beiden pankreatischen Zelllinien (InR1-G9 und INS-1 Zellen) untersucht.

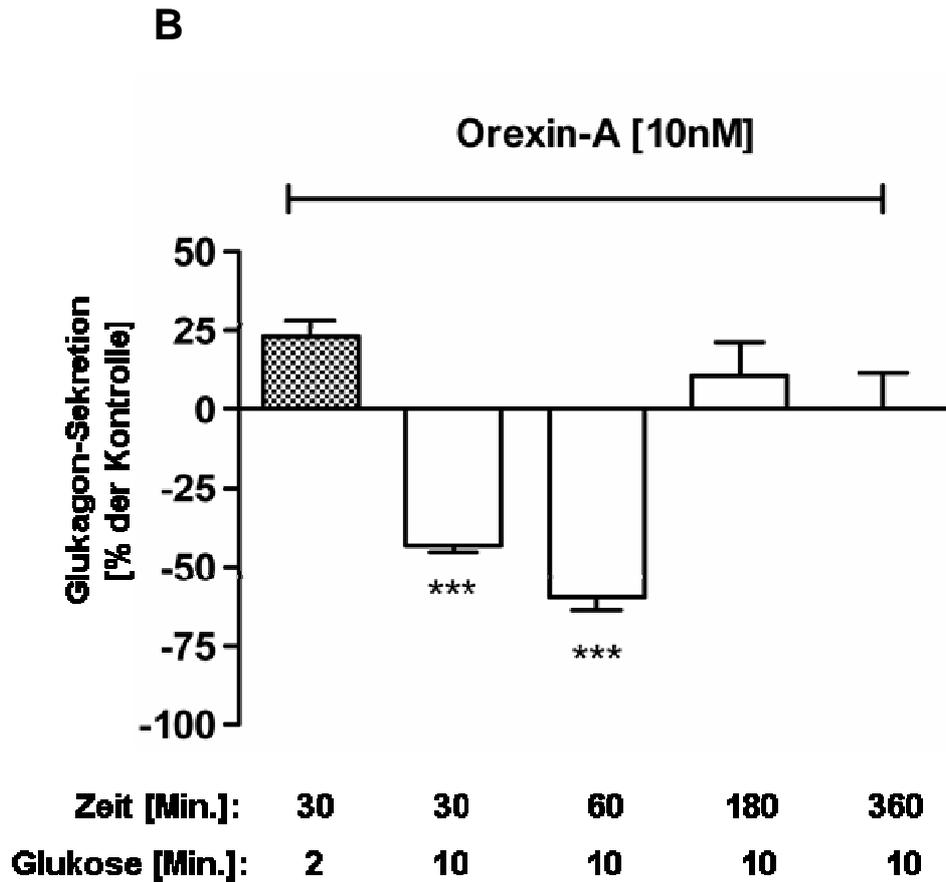
### 4.2.1 Effekte von OXA auf die A-Zellen

Die Freisetzung von Glukagon habe ich zunächst unter verschiedenen OXA Konzentrationen (siehe Abb. 12A) und in Abhängigkeit von der Zeit untersucht (siehe Abb. 12B).

Es zeigte sich ein dosisabhängiger hemmender Effekt von OXA auf die Glukagon-Freisetzung aus den InR1-G9 Zellen (siehe Abb. 12A).

Die Glukagonkonzentration im Überstand der InR1-G9 war bereits nach einer halbstündigen OXA-Exposition signifikant verringert. Nach drei bzw. sechs Stunden waren die Effekte nicht mehr nachweisbar (siehe Abb. 12B).





**Abbildung 12:**

**Effekte von OXA auf die Regulation der Glukagon-Sekretion in InR1-G9-Zellen.**

A) Dosisabhängige Hemmung der Glukagonsekretion aus InR1-G9-Zellen. Die Zellen wurden 30 Minuten mit 10 mM glukosehaltigem, serumfreiem Medium mit den angegebenen OXA-Konzentrationen behandelt. Die Daten sind als nicht-lineare-Regressionskurve dargestellt (N=3).

B) Zeitabhängige Hemmung der Glukagon-Freisetzung aus InR1-G9-Zellen. Die Zellen wurden mit serumfreiem 10 mM Glukose-haltigem Medium mit 10 nM OXA für die angegebene Zeit behandelt. Die Daten sind als prozentuale Veränderungen relativ zur Kontrolle dargestellt. Als Kontrollen dienten Zellen, die ohne OXA Zeit inkubiert wurden. Angegeben sind die Mittelwerte und SD (N=3). Signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle \*\*\* ( $p < 0,001$ ) wurde mittels Student's t-test ermittelt.

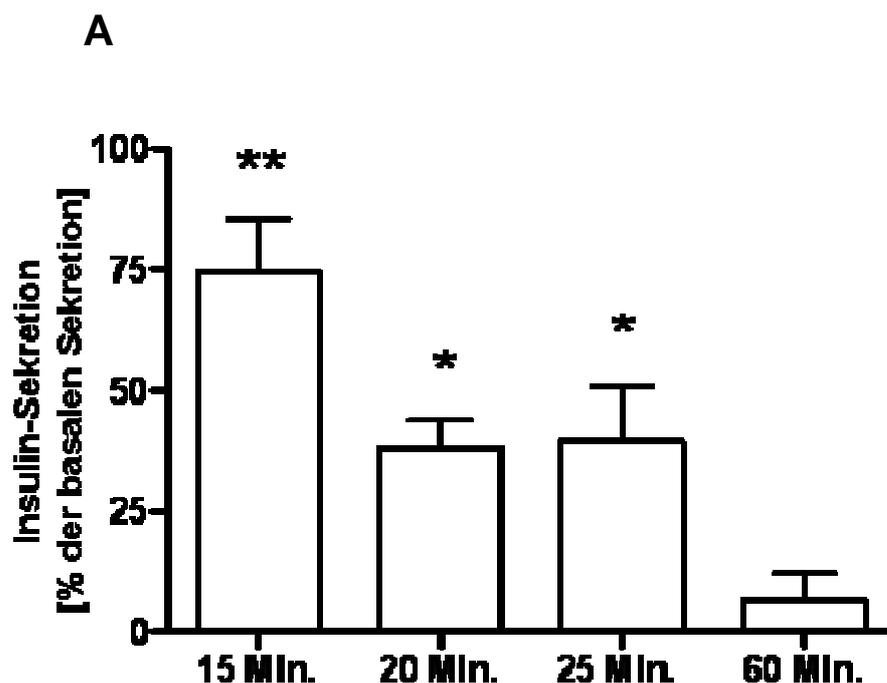
## 4.2.2 Effekte von OXA auf die B-Zellen

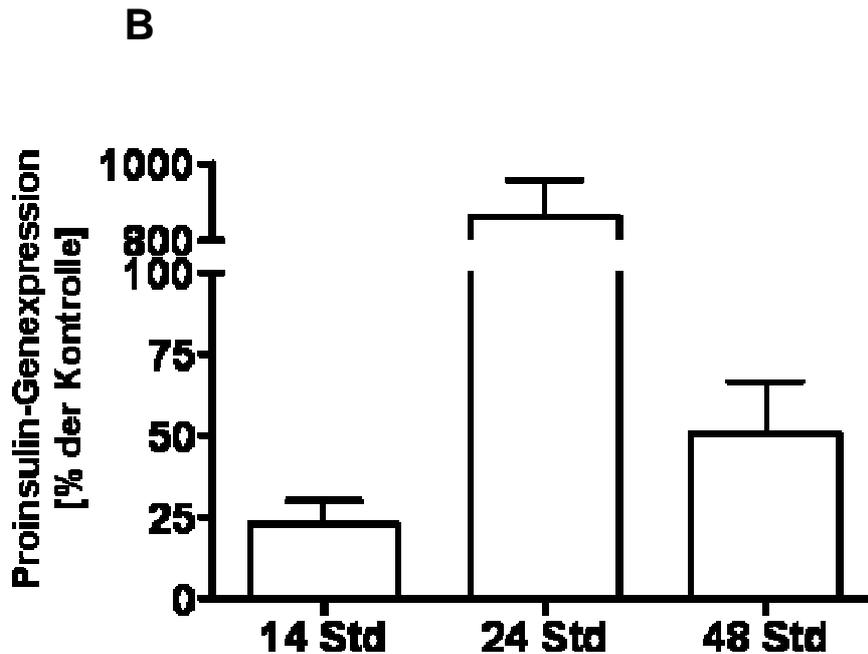
Zunächst habe ich die physiologische Sekretion von INS-1-Zellen in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration im Inkubationsmedium untersucht. Dabei beobachtete ich, dass die größten Veränderungen der Sekretion bei 3 mM Glukose detektierbar waren. Daher habe ich die weiteren Experimente bei dieser Glukosekonzentration geführt.

Anschließend habe ich die Insulinsekretion nach Inkubation der INS-1 Zellen mit 10 nM OXA untersucht. Die Insulinkonzentration habe ich aus dem Überstand der Zellen mittels ELISA gemessen (siehe Abb. 13 A) und darüber hinaus die Expression der Proinsulin-mRNS mit Hilfe der qRT-PCR quantifiziert (siehe Abb. 13 B).

Bereits 15 Minuten nach Beginn der OXA-Behandlung der INS-1 Zellen stieg die Insulin-Freisetzung signifikant an. Die gesteigerte Sekretion war über einen Zeitraum von 25 Minuten detektierbar und sank nach einer Stunde wieder leicht ab. Die Proinsulin-mRNS Expression zeigte sich nach 14, 24 und 48 Stunden nach Beginn der OXA-Inkubation relevant erhöht. Der maximale Effekt auf die Proinsulin-mRNS Expression zeichnete sich nach 24 Stunden ab mit einer fast 800-fachen Steigerung

Zusammenfassend steigert OXA die Insulinfreisetzung innerhalb von wenigen Minuten nach Behandlungsbeginn. Die Effekte auf die Expression der Proinsulin mRNS lassen sich nach mehreren Stunden Behandlung abbilden.





**Abbildung 13:**  
Rolle von OXA für die Regulation der Insulinsynthese in INS-1-Zellen.

A) Freisetzung von Insulin aus INS-1-Zellen nach unterschiedlich langen Behandlungen mit OXA (10 nM). Die Messung des sezernierten Insulins erfolgte aus den Überständen mittels eines Insulin-ELISAs. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und SD dargestellt (N=3). Signifikanzen: \* ( $p < 0,05$ ) \*\* ( $p < 0,01$ ) statistisch signifikante Unterschiede zur basalen Sekretion, errechnet durch den Student's t-Test.

B) Effekt der OXA-Behandlung (10 nM) auf die Proinsulin-Genexpression. Die mRNA wurde mit qRT-PCR quantifiziert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und SD dargestellt (N=3).

### 4.3 Effekte von OXA auf die Proglukagon mRNA-Expression

Den Effekt von OXA auf die Proglukagon mRNA-Expression habe ich mittels qRT-PCR quantifiziert (siehe Abb. 14). Die hemmenden Effekte von OXA auf die Expression von Proglukagon-mRNA zeichneten sich nach 8 Stunden ab und konnten bis 48 Stunden nach Behandlung nachgewiesen werden. Die maximale Hemmung zeigte sich nach 24 Stunden mit einer 80%-igen Hemmung der Proglukagon-mRNA Expression.

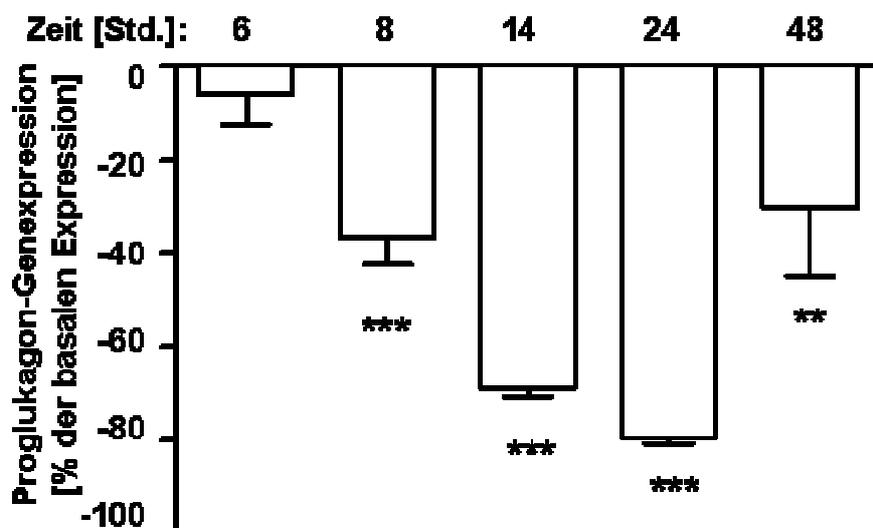


Abbildung 14:

#### Effekte von OXA auf die Proglukagon mRNA-Expression in InR1-G9-Zellen.

Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit OXA (10 nM) inkubiert. Die Proglukagon mRNA wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. Die Expressionsrate von Proglukagon mRNA wurde auf die Expressionsrate des mitgeführten  $\beta$ -Aktin-Gens normalisiert. Als Kontrolle diente die Proglukagon-Genexpression der unbehandelten Zellen. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SD (N = 4). \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 zur Basalexpression (definiert als 0) mittels Student`s t- test.

### 4.3.1 Charakterisierung von intrazellulären Signaltransduktionskaskaden

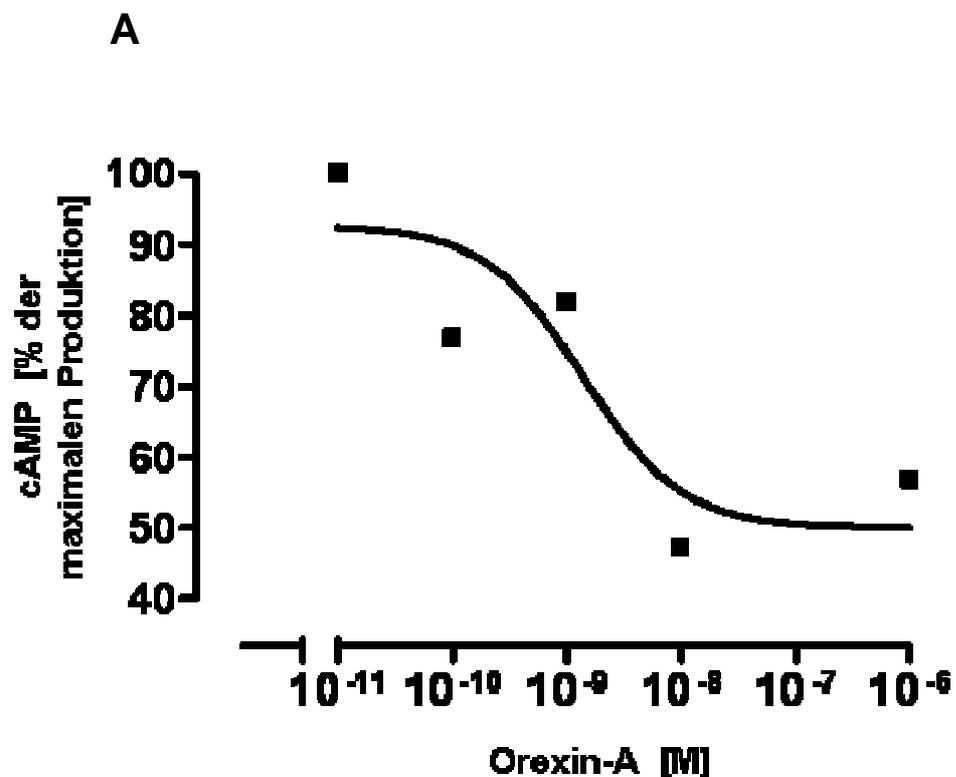
Nach dem Nachweis des Einflusses von OXA auf die sekretorische Aktivität und auf die Expression von Glukagon in pankreatischen A-Zellen stellte sich die Frage, welche Signaltransduktionskaskaden bei der Vermittlung dieser Effekte eine Rolle spielen.

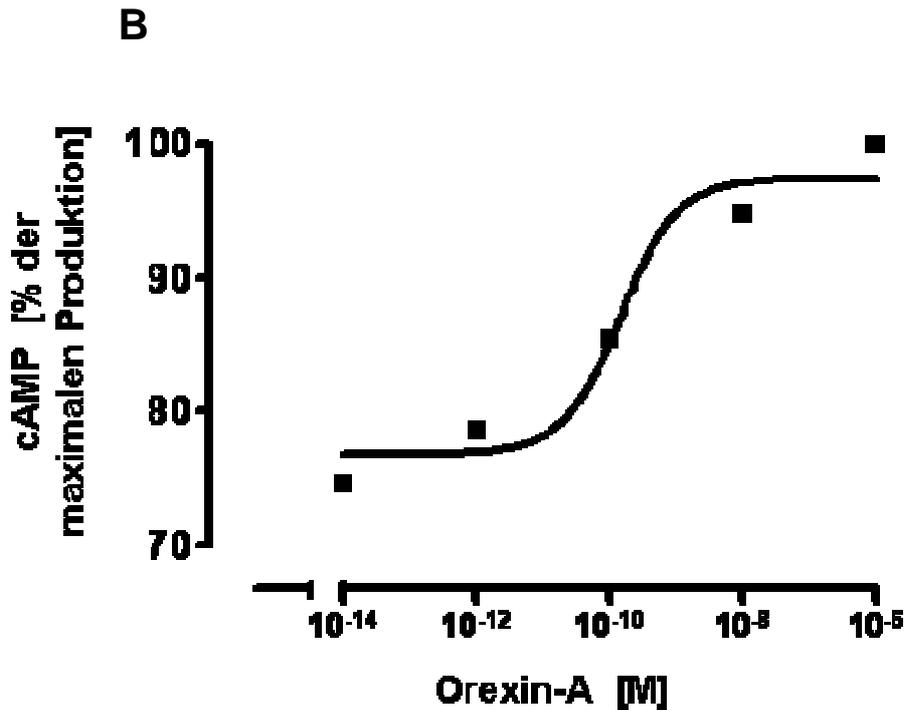
Ein wichtiges Signaltransduktionsmolekül für die Regulation der Proglukagon-Genexpression und -Transkription ist cAMP. cAMP wird aus Adenosintriphosphat (ATP) nach Aktivierung des Enzyms Namens Adenylatcyclase gebildet. Die Aktivierung der Adenylatcyclase erfolgt durch Bindung des Ligandes an den Rezeptor, woran dieses Enzym gekoppelt ist. cAMP bindet an ein entsprechendes Protein (cAMP-responsive

element-binding Protein (CREB), welches durch Phosphorylierung aktiviert wird (pCREB). CREB spielt eine wichtige Rolle für die Vermittlung der glukoseabhängigen Insulinsekretion sowie Insulin-Genexpression in den pankreatischen B-Zellen (Dalle S. et al. 2011). Die Glukagon vermittelten metabolischen Effekte sind auf subzellulärer Ebene ebenfalls an cAMP gekoppelt (Unger R.H. et al. 1985).

Daher habe ich zunächst die intrazellulären cAMP-Konzentrationen nach OXA-Behandlung sowohl in den InR1-G9- als auch in INS-1- Zellen gemessen (siehe Abb. 15).

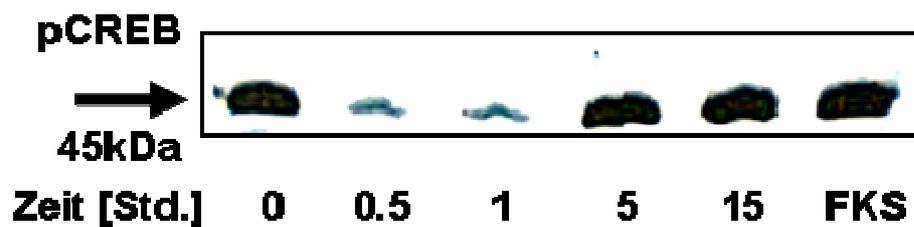
Die cAMP-Konzentrationen in den INS-1-Zellen stiegen durch eine Inkubation mit OXA dosisabhängig an. Im Gegensatz dazu sanken die cAMP-Konzentrationen in den InR1-G9-Zellen. Die sinkenden cAMP-Konzentrationen in den InR1-G9-Zellen wurden von einer transienten Abnahme von phosphoryliertem CREB begleitet (siehe Abb. 16).





**Abbildung 15:**  
**Regulation der intrazellulären cAMP-Konzentration in InR1-G9 und INS-1-Zellen durch OXA.**

Dosis-abhängige Änderungen der intrazellulären cAMP-Konzentration in InR1-G9- (A) und INS-1-Zellen (B) nach einer 30 minütigen Behandlung mit OXA (10 nM). Die Daten sind als % der maximalen cAMP Produktion in Form einer nicht-linearen Regressionsanalyse dargestellt.



**Abbildung 16: Einfluss von OXA auf die CREB-Phosphorylierung in InR1-G9-Zellen.**

Zeitabhängige Hemmung der CREB-Phosphorylierung in InR1-G9-Zellen nach OXA-Behandlung (10 nM). Das Molekulargewicht von pCREB-Protein entspricht 45 kDa.

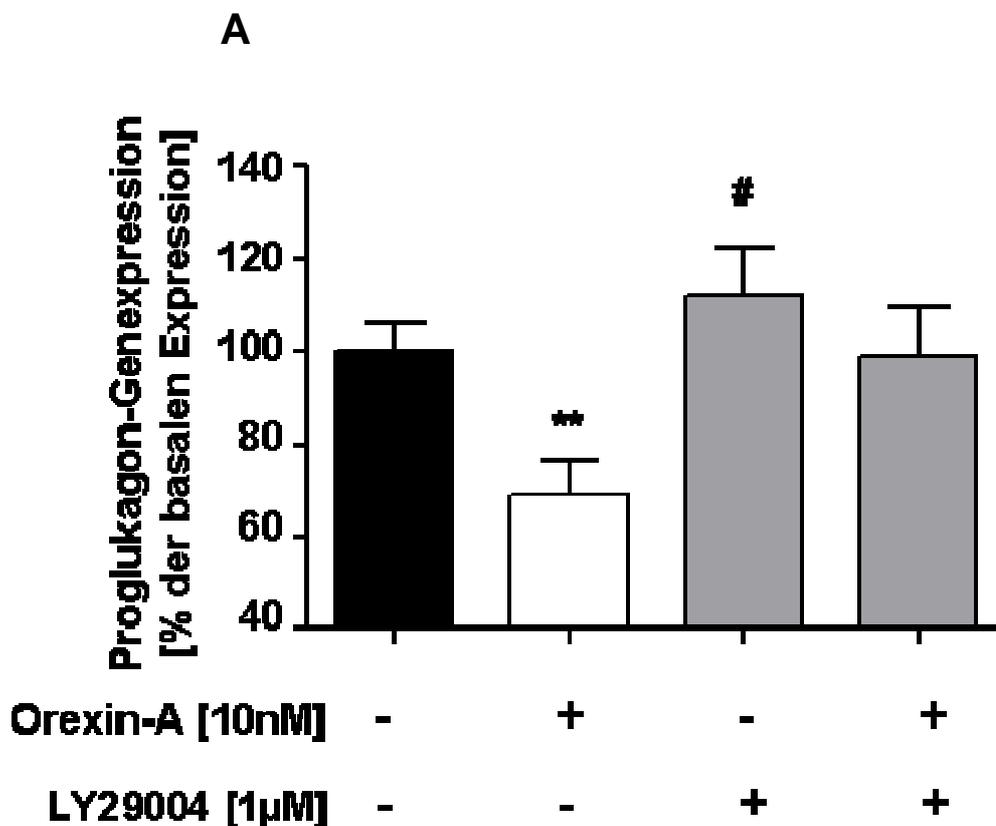
Western Blot mit einem pCREB-spezifischen Antikörper. Als positive Kontrolle dienten Zellen, inkubiert im FKS-haltigen Kulturmedium ohne OXA.

Um die Mechanismen der Inhibition der Proglukagon-Genexpression durch OXA genauer zu charakterisieren, habe ich die InR1-G9-Zellen in Gegenwart eines Inhibitors des PI3K-Signalwegs LY294002 inkubiert (siehe Abb. 17 A). Darüber hinaus habe ich auch den Einfluss von OXA auf die Phosphorylierung von weiteren Mediatoren des PI3K/PDK-1-Signalweges untersucht (siehe Abb. 17 B).

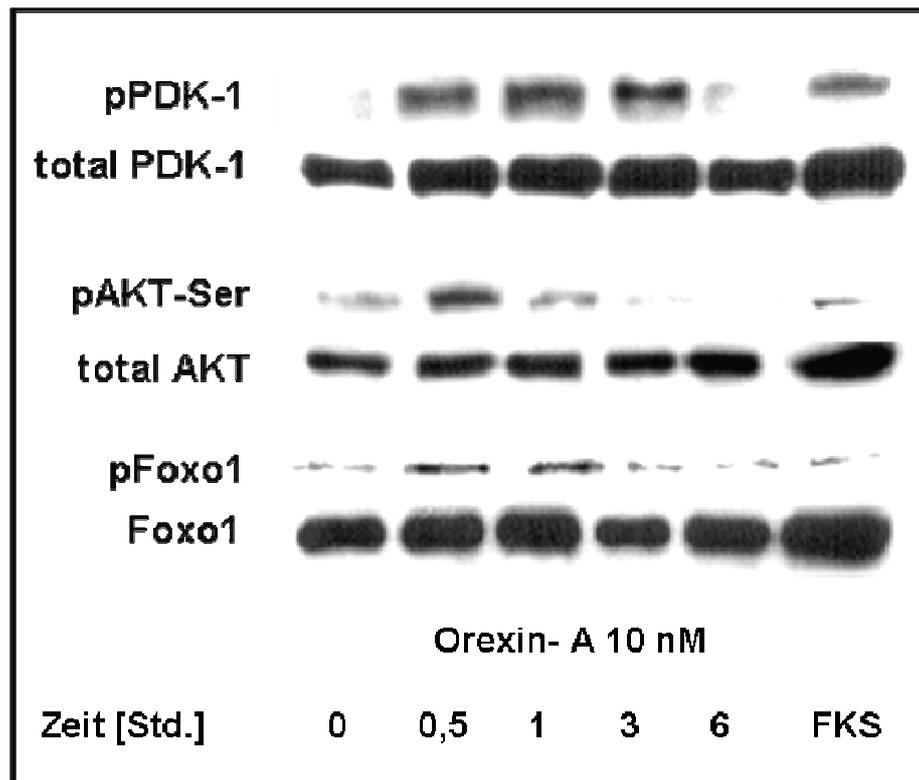
Der inhibitorische Effekt von OXA auf die Proglukagon-Genexpression konnte durch den PI3K-Inhibitor LY294002 aufgehoben werden (siehe Abb. 17 A, vierte Säule).

Die weiteren beteiligten Signaltransduktionskaskaden wurden auf Protein-Ebene mittels Western Blot untersucht. Die OXA-Behandlung von InR1-G9-Zellen führte zu einer transienten Phosphorylierung von PDK-1, AKT und FoxO1 (siehe Abb. 17 B).

Diese Daten zeigen, dass OXA den PI3-Kinase abhängigen Signaltransduktionsweg in den pankreatischen A-Zellen aktiviert.



**B**



**Abbildung 17:**  
**Phosphatidylinositol-3-Kinase-abhängige Regulation der Proglukagon mRNA-Expression durch OXA.**

A) Detektion der Proglukagon-Genexpression mittels qRT-PCR in InR1-G9-Zellen nach Behandlung mit OXA (10 nM) für 14 Stunden mit und ohne Zugabe von LY294002 (1  $\mu$ M). Angaben sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD. #  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zur Basalexpression (definiert als Null) mittels Student's t- test.

B) Western Blot-Analyse zur Detektion der Aktivierung (Phosphorylierung) von PDK-1, AKT und FoxO1 in InR1-G9-Zellen nach Behandlung mit OXA (10 nM). Die Detektion erfolgte mit Antikörpern, die die gesamte Proteinfraktion (gesamtes = total PDK-1, total AKT, total FoxO1) bzw. lediglich die phosphorylierten Proteine (pPDK-1, pAKT-Ser, pFoxO1) detektieren. Als negative Kontrolle dienten Zellen die nicht mit OXA-inkubiert wurden. Als Positivkontrollen dienten Zellen, die mit 10 % FKS inkubiert wurden.

### 4.3.2 Rolle des Transkriptionsfaktors FoxO1

Im Folgenden soll die Frage geklärt werden, ob der Transkriptionsfaktor FoxO1 an dem inhibitorischen Effekt von OXA auf die Proglukagon-Expression beteiligt ist. Dazu habe ich zunächst FoxO1 auf Proteinebene in den InR1-G9-Zellen nachgewiesen.

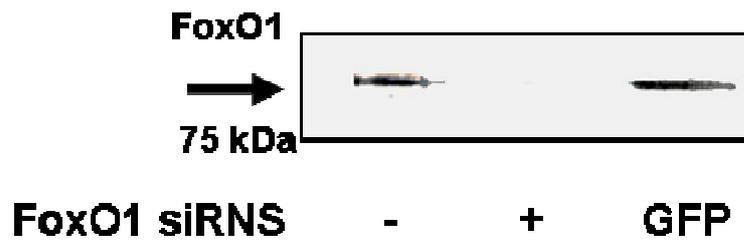
Sowohl die aktivierte (dephosphorylierte) als auch die inaktivierte (phosphorylierte) FoxO1-Isoformen wurde detektiert (siehe Abb. 17 B). Nach OXA-Behandlung kam es zu einer transienten Phosphorylierung (Inaktivierung) des FoxO1-Proteins (siehe Abb. 17 B). Durch Aufhebung der Aktivität von FoxO1 durch OXA Behandlung in den InR1-G9-Zellen lassen sich Effekte auf die zuvor ermittelte Gentranskription des Proglukagon-Gens vermuten.

Um die funktionelle Rolle von FoxO1 bei der Genregulation des Proglukagon-Gens genauer zu untersuchen, wurden InR1-G9-Zellen mit einer FoxO1-spezifischen siRNS transfiziert. Um die Effektivität der Suppression des FoxO1-Proteins in den Zellen beurteilen zu können, habe ich anschließend FoxO1-Protein in den transfizierten Zellen mittels Western blot visualisiert (siehe Abb. 18).

Die Abbildung 18 zeigt, dass die Proteinproduktion von FoxO1 in den FoxO1 siRNS-transfizierten Zellen vollständig unterdrückt wurde.

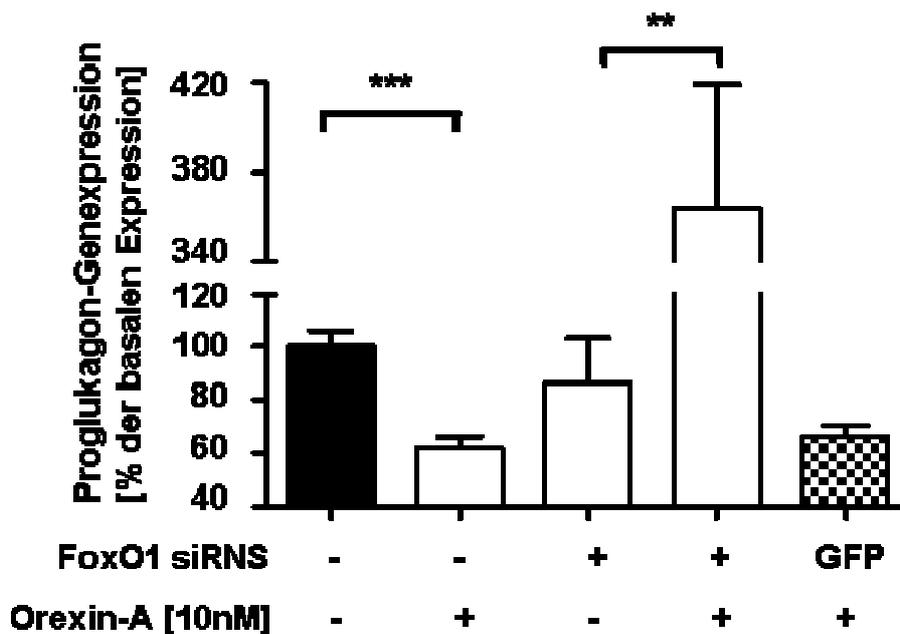
Die FoxO1-Protein-defizienten InR1-G9-Zellen wurden nun mit OXA behandelt, um den Einfluss von FoxO1 auf die OXA-vermittelte Inhibition der Proglukagon-Genexpression zu untersuchen (siehe Abb. 19). Zum Vergleich wurden InR1-G9-Zellen mit normaler FoxO1-Expression mitgeführt.

Wie Abbildung 19 zeigt, findet die OXA-vermittelte Inhibition der Proglukagon-Genexpression in den FoxO1-depletierten Zellen nicht statt. Vielmehr bewirkt eine OXA-Behandlung in diesen Zellen eine beträchtliche Steigerung der Genexpression.



**Abbildung 18: Detektion von FoxO1 in InR1-G9-Zellen.**

FoxO1 Proteinnachweis von 75 kDa Molekulargewicht. Fehlender Nachweis des FoxO1 Proteins nach Transfektion der InR1-G9-Zellen mit FoxO1- spezifischer siRNS (+). Als negative Kontrolle (-) erfolgte die Transfektion der InR1-G9-Zellen ohne Zugabe an FoxO1- siRNS. Als Kontrolle der Methodik erfolgte die Transfektion der InR1-G9-Zellen mittels GFP-siRNS.



**Abbildung 19: Rolle von FoxO1 bei der OXA-abhängigen Regulation der Proglukagon-Genexpression in InR1-G9-Zellen.**

InR1-G9 Zellen wurden mittels FoxO1 siRNS transfiziert. Hiernach erfolgte eine Behandlung mittels OXA (10 nM) für 14 Stunden. Die mRNA-Expression von Proglukagon wurde mittels qRT-PCR quantifiziert und auf  $\beta$ -Actin normalisiert. Als Kontrolle für die siRNS-Transfektion wurde eine Transfektion mittels GFP-siRNS verwendet. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SD (N=4). \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zum Basalwert (definiert als Null) mittels Student's t- test.

Nach Behandlung mit OXA detektierte ich die Phosphorylierung der FoxO1-Proteine in den InR1-G9-Zellen. Eine Hemmung der Hemmung der Proglukagon-Genexpression trat auf. Darüber hinaus konnte ich eine erhebliche Hemmung der Proglukagon-Expression nachweisen.

## 5 Diskussion

*In vivo* Experimente erbrachten den Nachweis, dass Orexin die Blutzuckerkonzentration beeinflusst (Nowak K.W. et al. 2005). Studien an Tieren mit regelrechter Insulinsekretion sowie an Tieren mit Insulindefizienz sprechen dafür, dass dieser Effekt nicht nur über die Regulation der pankreatischen B-Zellsekretion sondern möglicherweise auch durch Beeinflussung der pankreatische A-Zellsekretion vermittelt wird.

Die Effekte von OXA auf die Insulin-Freisetzung aus den pankreatischen B-Zellen wurden bereits in einer *in vitro* Studie von Nowak et al. beschrieben (Nowak K.W. et al. 2005). In jener Untersuchung konnte gezeigt werden, dass OXA konzentrationsabhängig die Insulin-Freisetzung am *in situ* perfundierten Ratten-Pankreas stimuliert (Nowak K.W. et al. 2005). Ehrström et al. haben *in vivo* in Ratten die Effekte des intravenös applizierten OXA auf die Plasma-Insulin- und Glukagon-Konzentration untersucht. Während der 30 minütigen OXA-Infusion konnte die Plasmakonzentration von Glukagon fallend detektiert werden. Dieser Effekt war allerdings von der zuvor eingestellten Blutglucose-Konzentration abhängig (Ehrström M. et al. 2004). Die Resultate der oben genannten Studien legen nahe, dass OXA die sekretorische Aktivität der pankreatischen A-Zellen beeinflussen kann.

Um die Hypothese einer direkten Interaktion von OXA mit Glukagon-produzierenden A-Zellen zu verifizieren habe ich in meiner Dissertation die direkte Interaktion von OXA mit den pankreatischen A-Zellen untersucht. Im Mittelpunkt stand die Charakterisierung der Regulation der Freisetzung von Glukagon und Proglukagon-Genexpression. Ich konnte mittels Western Blot, Immunzytologie und Immunhistochemie nachweisen, dass pankreatische A- Zellen sowie auch die B-Zellen OX1R exprimieren (Abbildungen 8, 9,

10, 11). Meine Ergebnisse bezüglich der OX1R Expression wurden später auch durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt (Adeghate E. et al. 2010).

Die Effekte von OXA auf die Glukagon- und Insulin-Freisetzung habe ich an gut etablierten Zelllinien untersucht. Die Besonderheit der monoklonalen Zelllinien im Vergleich zu Ganztieruntersuchungen besteht darin, dass die zellulären, direkten Effekte des Hormons exakt untersucht werden können. Indirekte Wirkungen, wie z. B. Interaktion von OXA mit dem adrenergen oder noradrenergen System (Wu X. et al. 2004), über die OXA die A-Zellen des Pankreas möglicherweise beeinflussen kann, sind in diesem System ausgeschlossen.

Für die *in vitro* Versuche habe ich INR1-G9 und INS-1 Zelllinien gewählt. Beide Zelllinien sind sehr gut charakterisierte und etablierte monoklonale, sekretorisch aktive endokrine pankreatische Zellen. Auch aufgrund der bereits erläuterten Homologie der OX1R zwischen Spezies eigneten sich die Zellen für die vorliegende Studie.

Die Freisetzung von Glukagon aus den InR1-G9-Zellen wurde konzentrationsabhängig durch OXA gehemmt. Der maximale hemmende Effekt zeigte sich unter Behandlung mit einer 10 nM OXA Konzentration (siehe Abb. 12). Die zeitliche Freisetzung von Glukagon war ähnlich wie im Falle der INS-1 Zellen mit etwas verzögertem Verlauf. Die maximalen Sekretionshemmung zeigte sich nach 1-3 Stunden OXA-Behandlung.

Im Hinblick auf die Interaktion von OXA mit pankreatischen B-Zellen zeigte sich binnen Minuten eine Steigerung der Insulin-Sekretion mit bereits nach maximal 1 Stunde abgeklungenem Effekt (siehe Abb. 13). Dies könnte in der Theorie bedeuten, dass die bereits zuvor gebildete Insulin aus Sekretionsvesikeln freigesetzt wurde. Die Effekte auf die Proinsulin-mRNS-Expression waren erst nach mehreren Stunden objektivierbar (siehe Abb. 13). Dies würde darauf hindeuten, dass die Insulin-Neusynthese ebenfalls durch OXA mitreguliert wird.

Die Effekte von OXA auf die Proglukagon mRNS-Expression sind als inhibitorisch zu bezeichnen (siehe Abb. 14) Die Hemmung der Proglukagon mRNS Expression zeigt sich nach mehreren Stunden.

Interessant war der zeitliche Verlaufsmuster von OXA auf die Glukagon- und Insulinsekretion. Sowohl in INS-1 als auch in InR1-G9-Zellen erreichte OXA die maximale sekretorische Wirkung nach 60 Minuten. Die Stimulation der Proinsulin-mRNS Expression und Hemmung der Proglukagon mRNS-Expression nach Inkubation mit OXA zeigten sich erst nach mehreren Stunden objektivierbar. Dies würde daraufhin hindeuten, dass OXA nicht nur auf die bereits im Zytoplasma vorhandene und präformierten Sekretionsvesikeln und wirkt, sondern auch auf die Neusynthese von Insulin und Glukagon über eine genomische Regulation beeinflusst.

Die Brücke zwischen den Effekten von OXA auf die Proglukagon- und Proinsulin-mRNS-Expression, OXA-Orexin-Rezeptor-Interaktion und Regulation der Sekretion bilden die von mir detektierten Signaltransduktionswege, die nach Ligandbindung aktiviert werden.

In der pankreatischen A- und B-Zellen wurden bereits mehrere Signaltransduktionsmoleküle identifiziert, die eine zentrale Rolle für die Regulation der Sekretionsvorgängen essentiell sind (Dalle S. et al. 2011; Costes S. et al. 2009). Einer dieser Moleküle ist CREB (cAMP response element-binding Protein). CREB wird durch Phosphorylierung von cAMP aktiviert (Dalle S. et al. 2011; Costes S. et al. 2009).

Auf die Verbindung zwischen der G-Protein gekoppelten OX1Rs und cAMP wurde bereits in der Arbeit von Zhu Y et al. hingewiesen (Zhu Y. et al. 2003). Hiernach habe ich die Verbindung zwischen dem G-Protein gekoppelten OX1R und Änderungen der intrazellulären cAMP-Konzentrationen in den pankreatischen A- und B-Zelllinien nachgewiesen.

In meinem Versuch zeigte sich erwartungsgemäß die cAMP-Konzentration in den INS-1 Zellen nach Inkubation mit OXA steigend (siehe Abb. 15 A), somit passend zu den Effekten auf die Proinsulin-Genexpression. Wiederum kam es zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der intrazellulären cAMP-Akkumulation durch OXA in InR1-G9-Zellen (siehe Abb. 15 B). Zeitlich betrachtet waren diese Effekte nach 30 minütiger OXA-Behandlung objektivierbar.

In Übereinstimmung dazu bewirkte OXA eine transiente Hemmung der Phosphorylierung des CREB in den InR1-G9 Zellen (siehe Abb. 16). CREB ist Teil der cAMP-abhängigen Transkriptionskaskade. Als nukleären Transkriptionsfaktor bindet CREB an die komplementären DNS-Regionen und kann dadurch zu einer Aktivierung

der Gentranskription führen. Diese Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung durch cAMP. Im Säugetiermodell wurde bereits die cAMP-abhängige Regulation des Proglukagon-Gens beschrieben. Mitunter gelang früher auch der Nachweis einer CRE Sequenz am Proglukagon-Gen-Promotor (Drucker D.J. et al. 1991, 1989). Drucker et al. berichten dennoch über eine unterschiedliche, vom Stimulus abhängige cAMP-Antwort und transkriptionelle Aktivierung des Zielgens.

Im Bezug auf meine Arbeit lassen die Ergebnisse zusammenfassend den Schluss zu, dass die OXA-bedingten Effekte auf die Expression von Glukagon durch herunterregulierte cAMP-Spiegel und reduzierte CREB-Phosphorylierung mitbedingt sind.

Ein zweiter, in der Proglukagon-Genregulation eine wichtige Rolle spielender Transduktionsweg, scheint PI3-Kinase abhängig. Die Aktivierung dieser Kaskade, zu der die Kinasen wie PKB (genannt auch als Akt), sowie PDK-1 gehören, führt zur Hemmung der Proglukagon-Gentranskription, wie es in der Arbeit von Schinner et al berichtet wird. (Schinner S. et al. 2005). Da OX1R ein G-Protein gekoppelter Rezeptor ist (Sakurai T. et al.1998) stellte sich die Frage, ob die Effekte von OXA auf die Glukagon-Freisetzung aus den InR1-G9 Zellen zum Teil über PI3-Kinasen vermittelt werden.

Auf Proteinebene konnte in der vorliegenden Arbeit eine transiente Phosphorylierung (Aktivierung) der "downstream Targets" PKB (AKT) und PDK-1 nach OXA-Behandlung in der InR1-G9 Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 17). Die Effekte auf die Proglukagon-mRNS-Expression zeigten sich nach Behandlung mit einem speziellen PI3K-Inhibitor aufgehoben (siehe Abb. 17).

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der inhibitorische Effekt von OXA auf die Proglukagon-Genregulation durch den PI3K/AKT/PDK-1-Signalweg vermittelt wird. Darüber hinaus beweisen die vorliegenden Ergebnisse die Beteiligung des Transkriptionsfaktors FoxO1 an der OXA-bedingten Inhibition der Proglukagon-Genexpression. Die Aktivierung bzw. Deaktivierung von FoxO1 erfolgt durch seine Phosphorylierung/Dephosphorylierung über den PKB/PDK-1 Signaltransduktionsweg (Nakae J. et al 2002). Eine gesteigerte Phosphorylierung von FoxO1 konnte in InR1-G9-Zellen zeitabhängig nach Inkubation mit 10 nM OXA nachgewiesen werden (siehe Abb. 17).

Die Funktion von FoxO1 als Vermittler der OXA-regulierten Proglukagon-mRNS-Expression konnte mittels siRNS-Technik gezeigt werden. Nach Optimierung der Transfektion war das FoxO1 Protein vollständig eliminiert (siehe Abb. 18). Dies erlaubte die Charakterisierung von OXA-Effekten auf die Glukagon-Genexpression FoxO1-Proteindefizienten InR1-G9 Zellen (siehe Abb. 19).

Depletion des FoxO1 Proteins in InR1-G9 Zellen führte zur Aufhebung der inhibitorischen Eigenschaft von OXA auf die Proglukagon-Genexpression. Paradoxe Weise war sogar eine gesteigerte Glukagon-Genexpression durch OXA zu beobachten. Eine Erklärung dafür wurde bisher noch nicht gefunden.

Die Limitation der Studie ergibt sich aus der Tatsache, dass es sich lediglich um eine in vitro Studie handelt. Daher stellt sich die Frage, ob die detektierten metabolischen Effekte von OXA in einem in vivo Kontext physiologisch relevant sind oder ob es sich lediglich um Begleitphänomen handelt ohne physiologische Bedeutung. Meine Studie beantwortet auch nicht die Frage, ob die Effekte nur durch OX1R vermittelt werden oder ob auch OX2R beteiligt ist.

Zusammenfassend betrachtet zeigt meine Arbeit erstmalig, dass OXA die Glukagonsynthese und -Freisetzung aus den pankreatischen A-Zellen über cAMP- sowie PI3-Kinase-abhängigen Signaltransduktionsweg beeinflusst. Des Weiteren konnte ich die FoxO1-abhängige Regulation der Proglukagon-Genexpression durch OXA in den pankreatischen A-Zellen nachweisen. Die Expression von OX1R auf pankreatischen A-Zellen sowohl auf mRNS- als auch auf Proteinebene legt nahe, dass die Interaktion von OXA mit den A-Zellen Rezeptor-vermittelt zustande kommt.

## 6 Literatur

1. Quesada I, Tudurí E, Ripoll C, Nadal A. Physiology of the pancreatic alpha-cell and Glucagon secretion: role in Glucose homeostasis and diabetes. *J Endocrinol.* 2008; 199:5-19.
2. Stefan Y, Grasso S, Perrelet A, Orci L. A quantitative immunofluorescent study of the endocrine cell populations in the developing human pancreas. *Diabetes.* 1983; 32(4):293-301.
3. Cabrera O, Bermann DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(7):2334-9.
4. Iki K, Pour PM. Distribution of pancreatic endocrine cells including IAPP-expressing cells in non-diabetic and type 2 diabetic cases. *J Histochem Cytochem.* 2007; 55(2):111-8.
5. Kilimnik G, Jo J, Periwál V, Zielinski MC, Hara M. Quantification of islet size and architecture. *Islets.* 2012; 4(2):167-72.
6. Farhy LS, McCall AL. Pancreatic network control of glucagon secretion and counterregulation. *Methods Enzymol.* 2009; 467:547-81.
7. Maruyama H, Hisatomi A, Orci L, Grodsky GM, Unger RH. Insulin within islets is a physiologic glucagon release inhibitor. *J Clin Invest.* 1984; 74(6):2296-9.
8. Kawamori D, Kurpad AJ, Hu J et al. Insulin signaling in alpha cells modulates glucagon secretion in vivo. *Cell Metab.* 2009; 9(4):350-61.
9. Starke A, Imamura T, Unger RH. Relationship of Glucagon suppression by insulin and somatostatin to the ambient Glucose concentration. *J Clin Invest.* 1987; 79(1):20-4.
10. Brunnicardi FC, Kleinman R, Moldovan S et al. Immunoneutralization of somatostatin, insulin, and Glucagon causes alterations in islet cell secretion in the isolated perfused human pancreas. *Pancreas.* 2001; 23(3):302-8.
11. González M, Böer U, Dickel C et al. Loss of insulin-induced inhibition of Glucagon gene transcription in hamster pancreatic islet alpha cells by long-term insulin exposure. *Diabetologia.* 2008; 51(11):2012-21.
12. Kaneko K, Shirohani T, Araki E et al. Insulin inhibits glucagon secretion by the activation of PI3-kinase in In-R1-G9 cells. *Diabetes Res Clin Pract.* 1999 ;44(2):83-92.
13. Unger RH. Reinventing type 2 diabetes: pathogenesis, treatment, and prevention. *JAMA.* 2008; 299(10):1185-7.

14. Takada K, Kanatsuka A, Tokuyama Y et al. Islet amyloid polypeptide/amylin contents in pancreas change with increasing age in genetically obese and diabetic mice. *Diabetes Res Clin Pract.* 1996; 33(3):153-8.
15. Fontés G, Zarrouki B, Hagman DK et al. Glucolipototoxicity age-dependently impairs beta cell function in rats despite a marked increase in beta cell mass. *Diabetologia.* 2010; 53(11):2369-79.
16. Lee Y, Hirose H, Ohneda M et al. Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(23):10878-82.
17. Poitout V, Robertson RP. Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology.* 2002; 143(2):339-42.
18. Grapov D, Adams SH, Pedersen TL, Garvey WT, Newman JW. Type 2 diabetes associated changes in the plasma non-esterified Fatty acids, oxylipins and endocannabinoids. *PLoS One.* 2012; 7(11):e48852.
19. Unger RH. Glucagon physiology and pathophysiology in the light of new advances. *Diabetologia.* 1985; 28(8):574-8.
20. Kilimnik G, Zhao B, Jo J et al. Altered islet composition and disproportionate loss of large islets in patients with type 2 diabetes. *PLoS One.* 2011; 6(11):e27445.
21. Unger RH, Orci L. The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet.* 1975; 1(7897):14-6.
22. Lee Y, Berglund ED, Wang MY et al. Metabolic manifestations of insulin deficiency do not occur without Glucagon action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109:14972-6.
23. Unger RH., Cherrington AD. Glucagonocentric restructuring of diabetes: a pathophysiologic and therapeutic makeover. *J Clin Invest.* 2012; 122 (1):4-12.
24. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M et al. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behaviour. *Cell* 1998; 92:573-85, 1998; 92(5):1 page following 696
25. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C et al. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:322-7.
26. Nakabayashi M, Suzuki T, Takahashi K et al. Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol Cell Endocrinol.* 2003; 205(1-2):43-50.
27. Arihara Z, Takahashi K, Murakami O et al. Orexin-A in the human brain and tumor tissues of ganglioneuroblastoma and neuroblastoma. *Peptides* 2000; 21:565-70.
28. Kastin AJ, Akerstrom V. Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 289(1):219-23.

29. Ammoun S, Holmqvist T, Shariatmadari R et al. Distinct recognition of OX1 and OX2 receptors by orexin peptides. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 305(2):507-14.
30. Heinonen MV, Purhonen AK, Mäkelä KA, Herzig KH. Functions of orexins in peripheral tissues. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008; 192(4):471-85.
31. Ehrström M, Gustafsson T, Finn A et al. Inhibitory effect of exogenous orexin a on gastric emptying, plasma leptin, and the distribution of orexin and orexin receptors in the gut and pancreas in man. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90 (4):2370-7.
32. Kirchgessner AL. Orexins in the brain-gut axis. *Endocr Rev*. 2002; 23(1):1-15.
33. Ouedraogo R, Näslund E, Kirchgessner AL. Glucose regulates the release of orexin-a from the endocrine pancreas. *Diabetes*. 2003; 52:111-7.
34. Adeghate E, Fernandez-Cabezudo M, Hameed R et al. Orexin-1 receptor co-localizes with pancreatic hormones in islet cells and modulates the outcome of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *PLoS One*. 2010; 5(1):e8587.
35. Peyron C, Faraco J, Rogers W et al. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med*. 2000; 6(9):991-7.
36. Nishino S, Ripley B, Overeem S et al. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *The Lancet* 2000, 355, pp. 39–40.
37. Nishino S, Ripley B, Overeem S et al. Low cerebrospinal fluid hypocretin (Orexin) and altered energy homeostasis in human narcolepsy. *Ann Neurol*. 2001; 50(3):381-8.
38. Nishino S, Mignot E. Article reviewed: Plasma orexin-A is lower in patients with narcolepsy. *Sleep Med*. 2002 ; 3(4):377-8.
39. Michihiro Mieda, Takeshi Sakurai. Overview of orexin/hypocretin system- Chapter 2. *Progress in Brain Research*. Volume 198, 2012, Pages 5–14.
40. Honda Y, Doi Y, Ninomiya R, Ninomiya C. Increased frequency of non-insulin-dependent diabetes mellitus among narcoleptic patients. *Sleep*. 1986; 9 (1 Pt 2):254-9.
41. Sakurai T. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8(3):171-81.
42. Gallmann E, Arsenijevic D, Williams G, Langerhans W, Spengler M. Effect of intraperitoneal CCK-8 on food intake and brain orexin-A after 48 h of fasting in the rat. *Regul Pept* 2005; 133:139-46.
43. Nowak KW, Strowski MZ, Switonska MM et al. Evidence that orexins A and B stimulate insulin secretion from rat pancreatic islets via both receptor subtypes. *Int J Mol Med*. 2005; 15:969-72.
44. Tsuneki H, Murata S, Anzawa Y et al. Age-related insulin resistance in hypothalamus and peripheral tissues of orexin knockout mice. *Diabetologia*. 2008; 51(4):657-67.

45. Tsuneki H, Sugihara Y, Honda R et al. Reduction of blood Glucose level by orexins in fasting normal and streptozotocin-diabetic mice. *Eur J Pharmacol.* 2002; 448(2-3):245-52.
46. Ehrström M, Naslund E, Levin F et al. Pharmacokinetic profile of orexin A and effects on plasma insulin and Glucagon in the rat. *Regul Pept.* 2004; 119:209-12.
47. Gross DN, van den Heuvel AP, Birnbaum MJ. The role of FoxO in the regulation of metabolism. *Oncogene.* 2008; 27:2320-36.
48. Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell.* 2004; 117:421-6.
49. Nakae J, Biggs WH, Kitamura T et al. Regulation of insulin action and pancreatic  $\beta$ -cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1. *Nat Genet.* 2002; 32:245-53.
50. McKinnon CM, Ravier MA, Rutter GA. FoxO1 is required for the regulation of preproglucagon gene expression by insulin in pancreatic alphaTC1-9 cells. *J Biol Chem.* 2006; 281(51):39358-69.
51. Imae M, Fu Z, Yoshida A et al. Nutritional and hormonal factors control the gene expression of FoxOs, the mammalian homologues of DAF-16. *J Mol Endocrinol.* 2003; 30:253-62.
52. Barthel A, Schmoll D, Unterman TG. FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2005; 16:183-89.
53. Leung-Theung-Long S, Roulet E, Clerc P. et al. Essential interaction of Egr-1 at an islet-specific response element for basal and gastrin-dependent glucagon gene transactivation in pancreatic alpha-cells. *J Biol Chem.* 2005;280(9):7976-84.
54. Dalle S, Quoyer J, Varin E et al. Roles and regulation of the transcription factor CREB in pancreatic  $\beta$  -cells. *Curr Mol Pharmacol.* 2011; 4(3):187-95.
55. Wu X, Gao J, Yan J et al. Hypothalamus-brain stem circuitry responsible for vagal efferent signaling to the pancreas evoked by hypoglycemia in rat. *J Neurophysiol.* 2004; 91(4):1734-47.
56. Costes S, Vandewalle B, Turrel-Cuzin C et al. Degradation of cAMP-responsive element-binding protein by the ubiquitin-proteasome pathway contributes to glucotoxicity in beta-cells and human pancreatic islets. *Diabetes.* 2009; 58(5):1105-15.
57. Zhu Y, Miwa Y, Yamanaka A et al. Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. *J Pharmacol Sci.* 2003; 92(3):259-66.
58. Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S. ProGlucagon gene expression and posttranslational processing in a hamster islet cell line. *Endocrinology.* 1988; 123(4):1861-7.

59. Drucker DJ, Campos R, Reynolds R et al. The rat Glucagon gene is regulated by a protein kinase A-dependent pathway in pancreatic islet cells. *Endocrinology*. 1991; 128(1):394-400.
60. Schinner S, Barthel A, Dellas C et al. Protein kinase B activity is sufficient to mimic the effect of insulin on Glucagon gene transcription. *J Biol Chem*. 2005; 280(8):7369-76.
61. Drucker DJ, Brubaker PL. ProGlucagon gene expression is regulated by a cyclic AMP-dependent pathway in rat intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(11):3953-7.
62. Sakurai T. Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior. *Regul Pept*. 1999; 85:25-30.

## 7 Anhang

### 7.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Eva Göncz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Effekte von Orexin-A auf die endokrine Funktion der pankreatischen A-Zelle“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

## **Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Eva Göncz hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Autoren: E. Göncz, M. Strowski, C. Grötzinger, S. Mergler, M. Theodoropoulou, G.K. Stalla, B. F. El-Zayat, B. Wiedenmann, U. Plöckinger

Titel: Orexin-A inhibits Glucagon secretion and gene expression by Foxo1 dependant pathway.

Zeitschrift: Endocrinology. 2008 Apr; 149(4):1618-26. Impact Factor: 4,9

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Leistungen der Promovendin bestanden in selbständiger Durchführung der Versuche, eingeständiger Interpretation der Daten, Präsentation der Ergebnisse i. R. von Labormeetings, sowie Erstellung des Manuskriptes unter meiner Anleitung.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## 7.2 Publikationsliste

1.

E. Göncz<sup>1</sup>, M. Strowski<sup>1</sup>, C. Grötzinger<sup>1</sup>, S. Mergler<sup>1</sup>, M. Theodoropoulou<sup>2</sup>, G.K. Stalla<sup>2</sup>, B. F. El-Zayat<sup>3</sup>, B. Wiedenmann<sup>1</sup>, U. Plöckinger<sup>1</sup> <sup>1</sup>Med. Klinik m. S. Hepatologie, Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel, Charité – Universitätsmedizin Berlin; <sup>2</sup>Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München; <sup>3</sup>Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Philipps-Universität Marburg.

Orexin-A inhibits Glucagon secretion and gene expression by Foxo1 dependant pathway.

Endocrinology. 2008 Apr; 149(4):1618-26. Impact Factor: 4,9.

2.

Singh V, Grötzinger C, Nowak KW, Zacharias S, Göncz E, Pless G, Sauer IM, Eichhorn I, Pfeiffer-Guglielmi B, Hamprecht B, Wiedenmann B, Plöckinger U, Strowski MZ  
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie, Interdisziplinäres Stoffwechsel-Centrum: Endokrinologie, Diabetes und Stoffwechsel, Charité-Universitätsmedizin, 13353 Berlin, Germany

Somatostatin receptor subtype-2-deficient mice with diet-induced obesity have hyperglycemia, nonfasting hyperglucagonemia, and decreased hepatic glycogen deposition.

Endocrinology. 2007 Aug; 148(8):3887-99. Impact Factor: 4,9.

### Vorträge, Posterpräsentationen:

9<sup>th</sup> Annual Meeting of the Neuroendocrinology Section of the German Society of Endocrinology, 2005, Indexed in Endocrinology and Diabetes,

41<sup>st</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Athens, 2005

European Congress of Endocrinology, Gothenburg, 2005

12<sup>th</sup> Meeting of the European Neuroendocrine Association, Athens, 2006 (Hot topic)

67<sup>th</sup> Scientific Sessions of the American Diabetes Association, Chicago, 2007

42<sup>st</sup> Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Copenhagen, 2006

19<sup>th</sup> International Symposium of Paediatric Surgical Research, Florence, Italy, 2006

## 7.3 Danksagung

An dieser Stelle danke ich sehr herzlich den Menschen, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Besonders danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Strowski. Seine unermüdliche Geduld und seine wertvollen Ratschläge haben mich auf dem Weg zum Gelingen dieser Arbeit begleitet.

Frau Prof. Dr. Plöckinger verdanke ich die Möglichkeit und die weitgehende Unterstützung, dieses Projekt umsetzen zu können.

Ein großer Dank geht an alle meine Kollegen im Forschungslabor (I. Eichhorn, Y. Giesecke, Dr. C. Grötzinger, Dr. S. Mergler, Dr. M. Theodoropoulou, S. Zacharias). Sie haben Ihr fundiertes Fachwissen mit mir geteilt als Voraussetzung, den hohen wissenschaftlichen Erwartungen der Institution gerecht zu werden. Ihre konstruktiven Kritiken stärkten meine Motivation auf dem teilweise steinigen Weg bis zum Ende der Arbeit.

Für die Liebe meiner Familie und den in mich gesetzten Glauben durch meine Freunde bin ich ebenfalls sehr dankbar.