

Aus der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt  
Hepatologie und Gastroenterologie der Medizinischen  
Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Funktionelle Bedeutung von Somatostatin für die  
pankreatischen Beta-Zellen und Adipozyten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Franziska Hofmann  
aus Berlin / Geburtsort Elsterwerda

Datum der Promotion: 05.06.2016

# Inhalt

<b>I</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>II</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>V</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Morphologie und Physiologie des endokrinen Pankreas .....	1
1.2	Physiologische Interaktion endokriner Alpha-, Beta- und Delta-Zellen des endokrinen Pankreas .....	3
1.3	Bedeutung der pankreatischen Alpha-, Beta- und Delta-Zellen für die Stoffwechselregulation.....	4
1.4	Insulinsekretionsstörung beim Diabetes mellitus Typ 2 .....	5
1.5	Fettgewebe .....	6
1.6	Somatostatin.....	7
1.7	Somatostatinrezeptoren (SSTR).....	8
1.8	SSTR-Verteilung im Körper .....	9
1.9	Physiologische Funktionen von SSTRs .....	10
1.10	Zielsetzung/Fragestellung.....	10
<b>2</b>	<b>Methodik, Material und Reagenzien</b> .....	<b>11</b>
2.1	Geräte.....	11
2.2	Chemikalien .....	12
2.3	Lösungen und Puffer.....	14
2.4	Kit-Systeme.....	15
2.5	Primer .....	15
2.6	Antikörper .....	16
2.7	Zellen.....	17
2.8	Software.....	17
2.9	Isolation von Adipozyten der Ratte.....	17
2.10	3T3-L1 Zellkultur und Differenzierung.....	18
2.11	Kultivierung der INS-1E Zellen.....	18
2.12	Bestimmung der Triglyceride in Adipozyten .....	19
2.13	Oil red O Methode zur Visualisierung der Triglyceride in Adipozyten .....	19
2.14	Lipolyse .....	20
2.15	Lipogenese .....	20

2.16	Glukoseaufnahme in die Zellen .....	20
2.17	Western Blot .....	21
2.18	Quantitative real-time PCR.....	22
2.19	Statistik.....	23
<b>3</b>	<b>Effekte von SST auf die Funktion von Insulin-produzierenden Zellen (INS-1E) .....</b>	<b>24</b>
3.1	Effekte von SST auf die Proinsulin mRNA Expression.....	24
3.2	Effekte von SST auf die Glukoseaufnahme in INS-1E Zellen und auf die Translokation des Glukosetransporters-2 (Glut2) .....	26
3.3	Effekte von SST auf die INS-1E Zellproliferation.....	27
3.4	Effekte von SST auf die Expression des Transkriptionsfaktors Foxo-1 in INS-1E Zellen.....	29
3.5	Effekte von SST auf die Expression von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren .....	33
3.6	Effekte von SST auf die Funktion von Adipozyten .....	35
3.6.1	Detektion der SSRTs in Präadipozyten und differenzierten Adipozyten .....	35
3.6.2	Effekte von SST auf die Lipolyse in Adipozyten .....	37
3.6.3	Effekte von SST auf die Lipogenese .....	39
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>41</b>
<b>III</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>IV</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>X</b>
<b>V</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>XIII</b>
<b>VI</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>XIV</b>
<b>VII</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>XV</b>

# I Abkürzungsverzeichnis

AKT .....	PKB = Proteinkinase-B
BCA .....	Bicinchoninsäure
BSA .....	bovines Serumalbumin = Rinderserumalbumin
cAMP .....	zyklisches (cyclic) Adenosinmonophosphat
cDNS .....	komplementäre DNS
DNS.....	Desoxyribonukleinsäure
DMEM .....	engl.: Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO .....	Dimethylsulfoxid
EDTA .....	Ethylendiamintetraessigsäure
Exe .....	Exendin
FKHR .....	engl.: forkhead found in human rhabdomyosarkoma
FKS .....	Fetales Kälberserum
Foxo .....	forkhead-box-O1 Protein
GLP.....	engl.: Glucagon-like peptide
GLUT .....	Glukosetransporter
GRH.....	Corticotropin-releasing-hormon
IBMX .....	3-Isobutyl-1-methylxanthine
IGF.....	engl.: Insulin-like growth factor
KRBH.....	Krebs-Ringer Bikarbonat Hepes Puffer
MAP.....	engl.: mitogene-activated protein
mM .....	millimolar
µM .....	mikromolar
mRNS .....	engl.: messenger ribonucleic acid
pAKT .....	phosphoryliertes AKT (Proteinkinase-B)
pFoxo .....	phosphoryliertes FoxO1
Pax4 .....	engl.: Paired box gene
PBS.....	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS-T .....	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit 0,2 % Tween-20
PCR.....	Polymerase-Kettenreaktion
PDK .....	Phosphatidylinositol-Phosphat-abhängige Kinase
PDX.....	engl.: Pancreatic and duodenal homeobox
PI3K.....	Phosphatidylinositol-3-Kinase
RNS.....	Ribonukleinsäure
SDS .....	Sodium-dodecyl-sulphate
SST.....	Somatostatin

---

SSTR .....	Somatostatinrezeptor
TEMED .....	Tetramethylethyldiamin
TNF $\alpha$ .....	Tumornekrosefaktor-alpha
TRH .....	Thyreotropin-releasing-hormon
TRIS .....	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl .....	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid Puffer

## II Abstract

### I.1 Deutsche Fassung

**Einleitung:** Somatostatin (SST) hemmt die Freisetzung des anabol-wirkenden Insulins und des Insulingegenspielers Glukagon. SST-Agonist Octreotid kann die Fettgewebssmasse reduzieren und einen Gewichtsverlust bei übergewichtigen Patienten verursachen. Es ist unklar, ob die Hemmung der Insulinsekretion die Grundlage der gewichtsreduzierenden Eigenschaft von Octreotid ist.

In der aktuellen Studie wird untersucht, ob SST neben der Regulation der Insulinsekretion auch die Insulinneusynthese, Beta-Zellproliferation, sowie Funktionen der Adipozyten (Lipolyse, Lipogenese) beeinflusst. Weiterhin wurde untersucht ob Somatostatinrezeptoren (SSTR) auf Adipozyten exprimiert werden.

**Material und Methoden:** Für die Untersuchungen wurde eine etablierte, insulinproduzierenden Beta-Zelllinie der Ratte (INS-1E) verwendet, sowie primäre Adipozyten der Ratte. 3T3-L1 Präadipozyten der Maus wurden zu reifen Adipozyten differenziert. Die mRNA Expression von Proinsulin, SSTRs, Wachstumsfaktor-Rezeptoren (IGF-1, IGF-2, Insulin) wurde mittels RT-PCR und real-time PCR detektiert. Gesamtproteine und Proteinphosphorylierung von Kinasen (AKT, p85, Foxo-1, PDX) wurden mittels Western Blot analysiert. Glut2-Translokation wurde aus Membranpräparation der INS-1E Zellen bestimmt. Utilisation von Glukose in INS-1E Zellen wurden mittels 2-Deoxyglukose gemessen. Lipolyse wurde über die Messung von freiem Glycerol bestimmt. Lipogenese wurde über die Berechnung der Radioaktivität des lipidhaltigen Überstandes ermittelt. Der Fettgehalt der Adipozyten wurde mit dem Oil-red O Assay dargestellt.

**Ergebnisse:** SST und ein SSTR2-Agonist hemmten die GLP-1 stimulierte Proinsulin-mRNA Expression in den INS-1E Zellen. Beide SSTR-Liganden hemmten die Glut2 Translokation in die Plasmamembran sowie die aktive Glukoseaufnahme in die INS-1E Zellen. SST und SSTR2-Agonist hemmten die GLP-1- sowie IGF-1-stimulierte INS-1E-Zellproliferation. Der Proinsulin mRNA Synthese und Beta-Zell Proliferation stimulierende Transkriptionsfaktor Foxo-1, wurde durch SST phosphoryliert und somit inaktiviert. Die Expression/Phosphorylierung von Beta-Zell-trophischen Kinasen (Akt,

p85 Untereinheit der PI-3-kinase) sowie des Transkriptionsfaktors PDX-1 wurden durch SST gehemmt. Die Expression von Wachstumshormon-Rezeptoren (IGF-1 und IGF-2) auf INS-1E Zellen wurde durch SST reduziert.

3T3-L1 Präadipozyten exprimierten SSTR1-3 sowie SSTR5 mRNA. In reifen 3T3-L1 Adipozyten stieg die SSTR2 und SSTR5 mRNA-Expression an, während SSTR1 sowie SSTR3 Expression abnahmen. SST und SSTR2-Agonist stimulierten die basale sowie Glukagon-induzierte Lipolyse in den reifen Adipozyten. Sowohl die basale als auch die Insulin-stimulierte Lipogenese wurde durch beide SST-Agonisten gehemmt. Daraus resultierte Abnahme des Lipidgehaltes in Adipozyten.

**Zusammenfassung:** SST hemmt die Insulinproduktion, Beta-Zellprolifer-ation sowie die Lipogenese. Darüber hinaus reduziert SST die anabole Insulin-Wirkung auf die Adipozyten, indem die Lipolyse stimuliert und die Lipogenese gehemmt wurde. Dies ist möglicherweise erklärend für den beschriebenen Gewichtsverlust bei Patienten, die im Rahmen einer Studie mit Octreotid behandelt wurden. Aus therapeutischer Sicht kann SST eine potentielle und weiter zu evaluierende Option für die Therapie von Adipositas darstellen.

## I.2 Englische Fassung

**Introduction:** Somatostatin (SST) inhibits insulin and glucagon secretion. In a clinical study obese patients were treated with the SST agonist octreotid. Octreotid reduces fat mass and weight. Supposedly the rationale behind octreotide's weight reducing effect is inhibited insulin secretion.

This in vitro study examines SST's influence on various beta-cell activities and functions of adipocytes that could explain the weight reducing effect. Effects of SST on proinsulin-synthesis, beta-cell proliferation and the potentially underlying mechanisms were investigated. The analysis examined whether somatostatin receptors (SSTR) are expressed in adipocytes and whether SST affects lipolysis and lipogenesis.

**Materials and Methods:** An established insulin-producing beta-cell line of the rat (INS-1E clone) was used as well as Murine 3T3-L1 preadipocytes which were further differentiated into mature adipocytes. Furthermore primary rat adipocytes were used. mRNA expression of proinsulin, SSTRs and insulin-like growth factor receptors (IGF-1, IGF-2, insulin) were measured using RT-PCR and real-time PCR. Total proteins and protein phosphorylation of kinases (AKT, p85, Foxo-1, PDX) were analyzed using Western Blot. Glut2 translocation was measured using INS-1E membrane preparations after incubating cells with glucose. Glucose utilisation in INS-1E cells was measured using 2-deoxyglucose. Free glycerol levels were analysed to identify Lipolysis. Calculating the radioactivity level of lipid-containing supernatant determined Lipogenesis. The fat content of adipocytes was depicted in Oil-Red-O assay.

**Results:** SST and a SSTR2 agonist inhibited GLP-1 stimulated proinsulin mRNA expression in INS-1E cells. Both SSTR-ligands inhibited Glut2 translocation into the plasma membrane and active glucose uptake into the INS 1E cells. SST and a SSTR2 agonist inhibited GLP-1 and IGF-1 stimulated beta-cell proliferation. Foxo-1 was phosphorylated by SST and inactivated. SST inhibited the expression/phosphorylation of beta-cell trophic factors (Akt, p85 subunit of PI-3-kinase) and transcription factor PDX-1. The receptor expression of IGF-1 and IGF-2 in INS-1E cells was reduced by SST. SSTR1-3 and SSTR5 were detected in 3T3-L1 pre-adipocytes at mRNA level. An increased SSTR2 and SSTR5 expression was associated with mature adipocytes. SSTR1 and SSTR3 expression decreased. SST and SSTR2 agonist stimulated basal and glucagon-induced lipolysis in mature adipocytes. Both SST agonists inhibited basal lipogenesis and insulin-stimulated lipogenesis. These SST effects resulted in a reduced lipid content in adipocytes.



**Summary:** SST inhibits insulin production, beta-cell proliferation and lipogenesis. SST reduces the anabolic effect of insulin in adipocytes by stimulating lipolysis and inhibiting lipogenesis. These properties may explain the described weight loss. SST could be potentially relevant for treating adiposity and subsequent studies should further evaluate this.

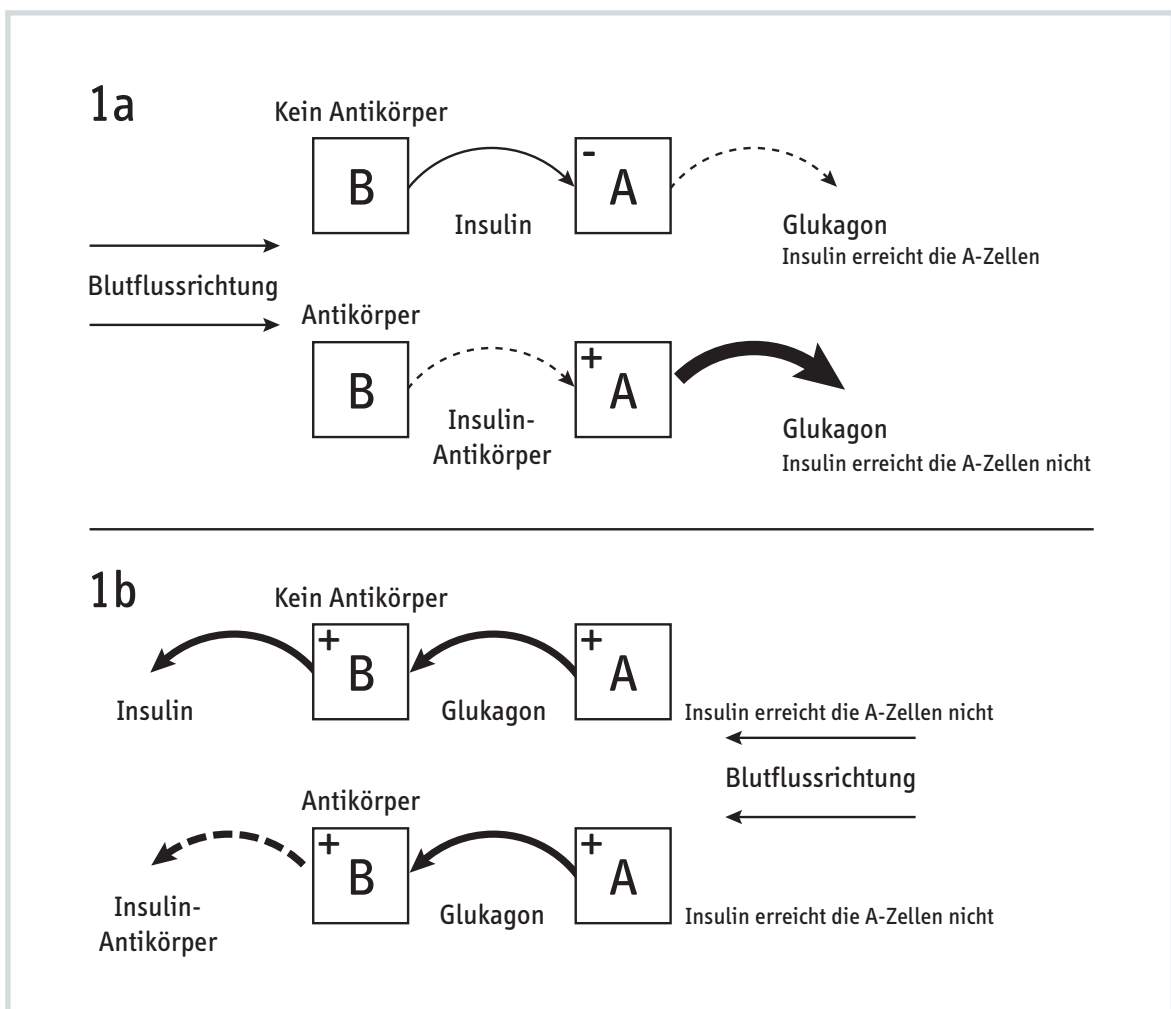
# 1 Einleitung

## 1.1 Morphologie und Physiologie des endokrinen Pankreas

Das Pankreas ist ein Drüsenorgan welches eine Schlüsselbedeutung für die Verdauung und Kontrolle der Blutzuckerhomöostase hat. Die endokrine Funktion des Pankreas wird von den Pankreasinseln getragen.

Im menschlichen gesunden Pankreas sind ca. 100,000 – 1,000,000 endokrine Inseln enthalten, die insgesamt ca. 1% der gesamten Pankreasmasse ausmachen (Quesada I. et al. 2008). Mindestens 20 unterschiedliche hormonsezernierende Zellen wurden bisher im endokrinen Pankreas beschrieben (Strowski M. Z. und Blake A. D. 2008). Am besten bekannt sind Zellen, die sich in erster Linie an der Regulation der Glukosehomöostase entweder direkt oder indirekt beteiligen. Am wichtigsten sind Insulin-sezernierende Beta-Zellen, sowie Glukagon-sezernierende Alpha-Zellen, aber auch Somatostatin-sezernierende Delta-Zellen spielen dabei eine Rolle (Cabrera O. et al. 2005). Zu den anderen gut bekannten Zelltypen des endokrinen Pankreas gehören PP-Zellen, die das pankreatische Polypeptid sezernieren, sowie Ghrelin-sezernierende Epsilon-Zellen (Andralojc K. M. et al. 2009). Mit ca. 60–70 Prozent sind im endokrinen Pankreas des Menschen die Beta-Zellen am häufigsten vertreten. Alpha-Zellen machen in etwa 26 Prozent und Delta-Zellen etwa 5–8 Prozent hormonell aktiver Zellen aus (Stefan et al. 1983; Iki K. & Pour P.M. 2007). Es gibt Spezies-spezifische Verteilungsmuster der Alpha-, Beta- und Delta-Zellen. Bei Mäusen liegen die Beta-Zellen im Zentrum der Pankreasinseln. Diese sind umgeben von einer Alpha- und Delta-zellreichen Peripherie (Cabrera O. et al. 2006). Im humanen Pankreas konnte dieses Verteilungsmuster nicht gezeigt werden. Hier fand sich eine eher uneinheitliche Verteilungsstruktur der Alpha-, Beta- und Delta-Zellen (Cabrera O. et al. 2006; Samols E. et al. 1986, 1988; Samols E. & Stagner J. I. 1990). Eine weitere Studie zeigte, dass hormonell aktive Zellen häufig nah an Kapillaren lokalisiert sind (Cabrera O. et al. 2005). Insgesamt sind die Inseln reichlich vaskularisiert. Der gerichtete Blutfluss hat eine Bedeutung für die Regulation der sekretorischen Aktivität der Pankreasinseln. Beim Menschen werden zunächst die Beta-Zellen von Arteriolen erreicht, die die Inselkapsel durchbrechen. Das insulinreiche Blut fließt dann von den Beta-Zell-reichen Arealen in die Alpha- und Delta-zellreiche Peripherie der Pankreasinseln (Samols E. et al. 1988). Daher unterliegen Alpha- und Delta- Zellen einer tonischen Regulation durch Insulin über die Kapillaren der Inseln. Samlos et al. führten ex vivo Perfusionsexperimente am Pankreas durch. In der anterograden Perfusion mit dem Anti-

Insulin Antikörper beobachteten sie einen Anstieg der Glukagonsekretion (Abb. 1). Bei der retrograden Perfusion erreichte Insulin die Alpha-Zelle nicht. Somit kam es zu einem Anstieg der Glukagon-Konzentration und zu einer Stimulation der Beta-Zelle. Anti-Insulin-Antikörper zeigte keinen Effekt (Abb. 1). Auf der anderen Seite spielt auch die parakrine Regulation der Inselzellen eine Rolle. Die Insulinfreisetzung wird so durch Glukagon und Somatostatin (SST) reguliert (Samlos E. et al. 1988). Die anatomische Voraussetzung hierfür ist gegeben, da die Beta-Zellen über die Synapsen-ähnliche Ausläufer der Alpha- und Delta- Zellen erreicht werden. Im Gegensatz dazu spielt die endokrine Regulation der Insulinsekretion (über die Blutzirkulation) hierbei eher eine untergeordnete Rolle (Samols E. et al. 1988).

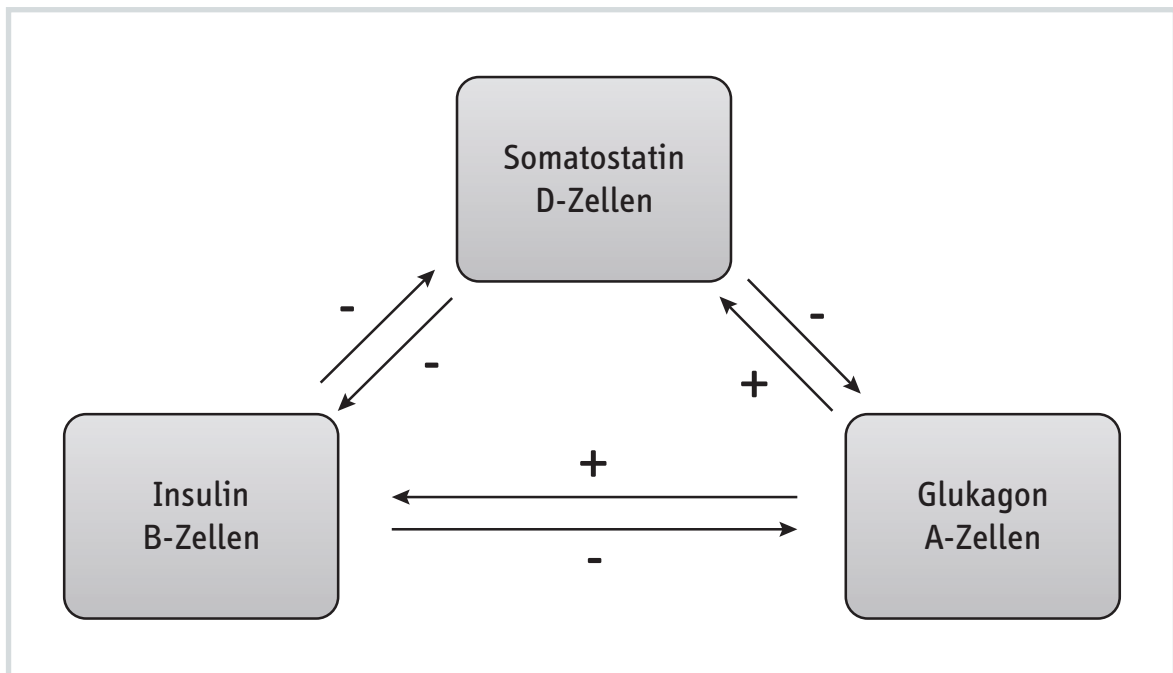


**Abbildung 1:** Die Abbildung zeigt ein ex vivo perfundiertes Pankreas der Ratte. **1a:** antergrade Perfusion mit Anti-Insulin-Antikörper, **1b:** retrograde Perfusion mit Anti-Insulin-Antikörper. Bei der anterograden Perfusion hemmt Insulin die A-Zelle und somit die Bildung von Glukagon (-). Anti-Insulin-Antikörper reduziert die Konzentration von Insulin und somit einen Anstieg der Glukagon-sekretion (+). Bei Fehlen

von Insulin (retrograde Perfusion) kommt es zu einer erhöhten Konzentration von Glukagon. Glukagon stimuliert die Beta-Zelle und somit die Bildung von Insulin (+). Anti-Insulin-Antikörper hat keinen Effekt bei der retrograden Perfusion (basierend aus Salmos E. et al. 1988).

## 1.2 Physiologische Interaktion endokriner Alpha-, Beta- und Delta-Zellen des endokrinen Pankreas

Die pankreatischen Alpha-, Beta- und Delta-Zellen regulieren sich gegenseitig. SST wirkt inhibitorisch sowohl auf die Insulin- als auch auf die Glukagonsekretion (Unger R. H. et al. 1978). Insulin hemmt die Glukagonsekretion, während Glukagon die Insulinsekretion stimuliert (Unger R. H. et al. 1978). Glukagon stimuliert die SST-Sekretion, während Insulin die SST-Sekretion hemmt (Abb. 2). Diese Wechselwirkungen von Insulin und SST lässt schließen, dass Insulin die eigene Sekretion über die Stimulation der SST-Sekretion hemmen kann (negativer Feedback). Die Sekretion von Glukagon und Insulin ist in erster Linie von der Blutzuckerkonzentration abhängig. Bei niedriger Blutglukosekonzentration wird die Glukagonsekretion stimuliert, während die Sekretion von Insulin abnimmt. Bei hoher Blutglukosekonzentration kommt es zu einer Hemmung der Glukagonausschüttung und Steigerung der Insulinsekretion. Die SST-Sekretion wird durch Glukose stimuliert. Diese gemeinsame Eigenschaft von SST- und Insulinproduzierenden Zellen im Hinblick auf die Glukosekonzentration ist nicht überraschend, da beide Zelltypen ontogenetisch von den gleichen Pax4-exprimierenden Vorläuferzellen stammen (Colombat P. et al. 2009).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Regulation zwischen Glukagon, Insulin und SST

Die Insulinsekretion wird v.a. durch die Glukosekonzentration im Blut gesteuert. Das sog. Glukose-sensing der Beta-Zellen ist auf das Vorhandensein von Glukosetransportern zurückzuführen. Bei hoher Blutglukosekonzentration gelangt Glukose durch das Transportprotein Glut-2 aktiv in die Zelle und wird dort oxidiert. Dabei entsteht ATP, welches einen spezifischen ATP-abhängigen Kalium-Kanal hemmt (Henquin J. C. 2000). Dadurch kommt es zur Depolarisation der Zellmembran. Dies führt zur Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle und extrazelluläres Calcium strömt in die Zelle (Henquin J. C. 2000). Calcium triggert die Sekretion von Insulin aus den Sekretionsvesikeln.

### 1.3 Bedeutung der pankreatischen Alpha-, Beta- und Delta-Zellen für die Stoffwechselregulation.

Die Hauptaufgabe der Beta-Zellen ist die Insulinsynthese und -freisetzung. Dies ist von verschiedenen Faktoren abhängig wie Nahrungsaufnahme, Hormonen des Pankreas sowie extrapancreatischen Hormonen. Nach Nahrungsaufnahme steigt die Blutglukosekonzentration an. Dies bewirkt die vermehrte Ausschüttung von Insulin. Insulin wirkt anabol (Quesada I. et al. 2008). Es stimuliert die Glukoseaufnahme in der Leber, im Muskel und im Fettgewebe sowie die Glykogen- und Lipidsynthese (Quesada I. et al. 2008). Eine weitere bedeutende Rolle für die Konstanthaltung der Glukosehomöostase

spielt Glukagon. Die Ausschüttung von Glukagon erfolgt bei Hypoglykämie. Glukagon stimuliert die Glykogenolyse sowie die Glukoneogenese in der Leber (Quesada I. et al. 2008). Damit wird neue Energie bereitgestellt und schützt so vor einer anhaltenden Hypoglykämie.

Die Ausschüttung von SST ist ebenfalls abhängig von der Nahrungsaufnahme. So ist die SST-Konzentration im Plasma bei Nahrungskarenz niedrig und steigt postprandial an (Strowski M. Z. & Blake A. D. 2008). Die Sekretion von SST wird durch Glukose, Aminosäuren (Arginin, Isoleucin), Ketonkörper sowie von Hormonen (Gastrin, Sekretin, Cholecystokinin) stimuliert (Strowski M. Z. & Blake A. D. 2008). Die prandial stimulierte Sekretion von SST führt zu einer Hemmung der Insulinfreisetzung und schützt möglicherweise vor einer postprandialen Hyperinsulinämie und Hypoglykämie (Brunnicardi F. C. et al. 2001, 2003). Daher wurde für SST der Begriff „Dekretin“ kreiert (Ensinck J.W. et al. 1997).

## 1.4 Insulinsekretionsstörung beim Diabetes mellitus Typ 2

Diabetes mellitus Typ 2 zeichnet sich durch chronische Hyperglykämie aus, die zu multiplen Organschäden führen kann. Für die Konstanthaltung der Blutglukose sind v. a. Insulin und Glukagon verantwortlich (Quesada I. et al. 2008). Eine Fehlfunktion der Beta- und Alpha-Zellen führt zur Hyperglykämie beim Diabetes mellitus Typ 2. Neben einer Dysfunktion der Beta-Zellen spielt die periphere Insulinresistenz beim Diabetes mellitus Typ 2 eine wichtige Rolle (Kahn C. R. 1994; Prentki M. et al. 2006). Die Mehrzahl der Patienten, die an einem Diabetes mellitus Typ 2 erkranken, ist übergewichtig. Übergewicht ist mit einer peripheren Insulinresistenz assoziiert. Da Insulin Glukose aus der Zirkulation nicht in die Zielzellen befördern kann, kommt es zu einer Hyperglykämie. Bei einem chronischen Zustand der Hyperglykämie, kommt es zu einer kompensatorisch gesteigerten Insulinsekretion (Kahn C. R. 1994; Prentki M. et al. 2006; Weyer C. et al. 1999). Dadurch versuchen die Beta-Zellen eine normale Glukose-Konzentration im Blut aufrechtzuerhalten (Kahn C. R. 1994; Prentki M. et al. 2006). Dabei kommt es initial zu einer Steigerung der Beta-Zell-Masse (Fontes G. et al. 2010; Prentki M. et al. 2006). Später kommt es zu einer Reduktion der Insulinsekretion, da die Kapazität der Beta-Zellen nicht ausreicht, genügend Insulin zu produzieren (Fontes G. et al. 2010; Prentki M. et al. 2006). Die Beta-Zellen erschöpfen sich. Neben der Funktionseinschränkung kommt es zu einer Atrophie oder Apoptose der Beta-Zellen. Im Zusammenhang mit dem Beta-Zellverlust wird sowohl die Glukotoxizität als auch die Lipotoxizität diskutiert (Lee Y.

et al. 1994, Robertson R. P. et al. 2004; Unger R. H. et al. 2008; Fontes G. et al. 2010). Weiterhin zeigt sich bei fast 70% der Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 eine relative Hyperglukagonämie. Dabei scheint die fehlende Suppression der Glukagonfreisetzung sowie der Glukagonproduktion durch Insulin eine Rolle zu spielen (Pankaj S. et al. 2000). Beim Diabetes mellitus Typ 2 werden therapeutisch Pharmaka eingesetzt, die entweder die Insulinsekretion steigern oder die Insulinwirksamkeit verbessern. Moderne Pharmaka wie z. B. Glucagon-like Peptide-1 Agonisten können sogar die Beta-Zell-Masse zumindest in Nagetieren steigern (Quesada et al. 2008). Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung wird, genauso wie beim Typ 1 Diabetes mellitus, Insulin therapeutisch eingesetzt. Wenn die Therapie mit Insulin unzureichend ist, nehmen die Patienten im weiteren Verlauf der Erkrankung sogar ab.

## 1.5 Fettgewebe

Das Fettgewebe ist das größte endokrine Organ des Körpers. Es sezerniert vielerlei Hormone und Zytokine. Zytokine sind Proteine, die neben der Immunregulation auch eine große Rolle hinsichtlich Zellwachstum und -differenzierung besitzen. Aufgrund dieser Eigenschaft kontrolliert das Fettgewebe eine Vielzahl von biologischen Vorgängen wie Appetit, Glukosehomöostase, Insulinsensitivität, Alterung, Fertilität oder die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur (Berry D. C. et al. 2013). Histologisch unterscheidet man 2 Arten von Fettgewebe: braunes und weißes Fettgewebe. Das braune Fettgewebe wandelt die zugeführten Nährstoffe in Energie um. Dies geschieht in Form von Wärme. Es scheint v.a. in der Neonatalperiode eine große Rolle zu spielen und ist bei adulten und anderen großen Säugetieren eher von geringerer Bedeutung (Berry D. C. et al. 2013). Ein Mangel an braunem Fettgewebe scheint mit der Entstehung von Adipositas assoziiert zu sein (Berry D. C. et al. 2013). Das weiße Fettgewebe dient zur Speicherung von Energie in Form von Lipiden. So kommt es bei einer metabolischen Fehlregulation wie Adipositas zu Hyperglykämie, Hyperlipidämie, Hypertonie, koronaren Gefäßerkrankungen, Diabetes mellitus und Lebererkrankungen (Rajala M. W. et al. 2003).

Das weiße Fettgewebe spielt als endokrines Organ eine wesentliche Rolle. Durch die Sekretion von sogenannten Adipokinen, hat es erheblichen Einfluss auf den systemischen Metabolismus (Trayhurn P. et al. 2001; Rajala M. W. et al. 2003). Adipokine sind Proteine, die vom Fettgewebe sezerniert werden. Diese besitzen eine Vielzahl von lokalen, peripheren und zentralen Effekten (Rajala M. W. et al. 2003). Zu den Adipokinen gehören Leptin, Adiponectin, Angiotensinogen, Interleukin-6, Adipsin, Plasminogen-

Aktivator-Inhibitor-1, Tissue Faktor oder Resistin (Trayhurn P. et al. 2001; Rajala M. W. et al. 2003). Das Fettgewebe ist außerdem Quelle für einige Zytokine. Dabei spielen TNF- $\alpha$  und Interleukin-6 eine wichtige Rolle (Mohamed-Ali V. et al. 1998). Beide sind proinflammatorische Zytokine (Mohamed-Ali V. et al. 1998), die einen wichtigen Einfluss auf den Fett- sowie Glukosemetabolismus haben (Mohamed-Ali V. et al. 1998). Sie sind mitverantwortlich für die Entstehung subklinischer Entzündungen, die auch beim Diabetes mellitus zu finden ist. Dies trägt zur Entstehung der Insulinresistenz bei (Mohamed-Ali V. et al. 1998; Rajala M. W. et al. 2003). Das Ausmaß der Entzündung korreliert mit dem Fettgehalt der Adipozyten und der Fettgewebssmasse.

## 1.6 Somatostatin

Im Gegensatz zu Insulin und Glukagon ist SST ein weniger bekanntes Hormon. SST wurde bereits 1968 von Krulich et al. isoliert (Kruclich et al. 1968) und 1978 von Brazeau et al. (Brazeau P. et al. 1978) als generell inhibitorisches Hormon beschrieben (Barnett P. 2003). SST-produzierende Zellen findet man im ZNS, im endokrinen Pankreas, endokrinen Zellen des Gastrointestinaltrakts, Schilddrüse, in den Nieren, in den Nebennieren, in der Prostata und in der Plazenta (Patel Y. C. 1999). SST hemmt als Neurotransmitter im Gehirn die Bildung von Dopamin. Weiterhin hemmt es das Wachstumshormon Somatotropin, Corticotropin-releasing-Hormone (GRH) sowie Thyreotropin-releasing Hormon (TRH) (Patel Y. C. 1999). Im Gastrointestinaltrakt hemmt SST die Bildung von nahezu allen Hormonen. SST hemmt die Bildung von Magensaft sowie Gallensäure und Pepsin. Außerdem inhibiert SST die Darmmotilität, die Entleerung des Magens und der Gallenblase (Patel Y. C. 1999; Kaczmarek P. et al. 2010).

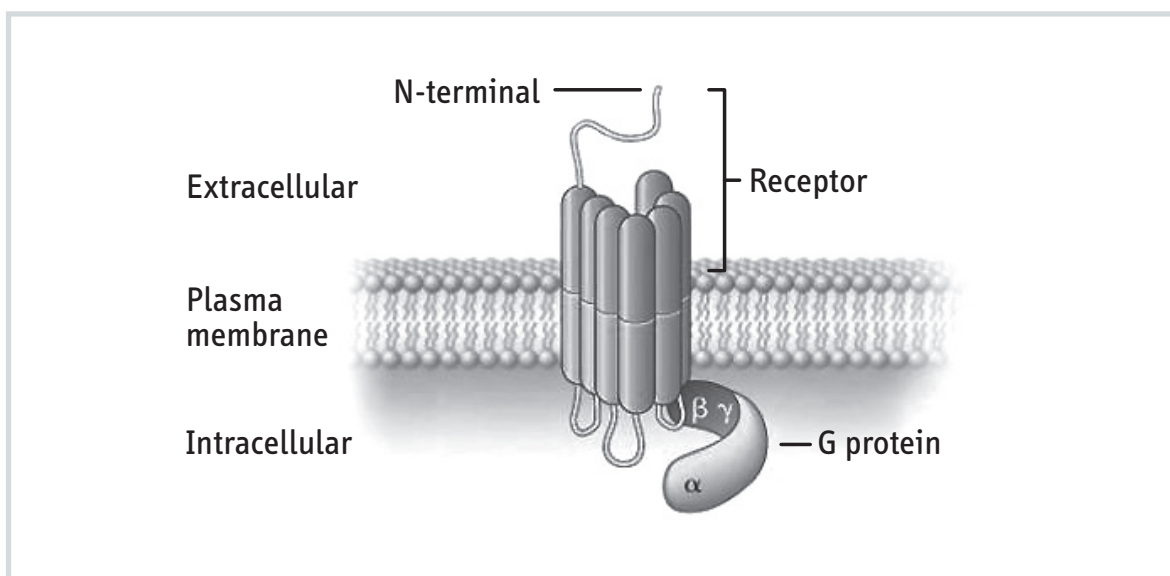
Es existieren zwei biologisch aktive Formen von SST, SST-14 und SST-28. SST reguliert diverse physiologische Prozesse wie Zellsekretion, Neuromodulation, Kontraktilität von glatten Muskelzellen, Resorption von Nährstoffen oder Zellwachstum (Patel Y. C. 1999). Weiterhin scheint es, dass SST eine Rolle in der Pathophysiologie von verschiedenen Erkrankungen zu spielen. Zu nennen wären Neoplasien, Diabetes mellitus, Morbus Alzheimer oder Morbus Huntington (Patel Y. C. 1999; Kumar U. et al. 1999).



## 1.7 Somatostatinrezeptoren (SSTR)

Es sind bisher 5 unterschiedliche Rezeptorsubtypen für SST bekannt (SSTR1 – SSTR5) (Patel Y. C. 1999). Sie wurden aus menschlichen Ratten- und Mäuse- Geweben kloniert. Alle Rezeptorsubtypen binden SST-14 und SST-28 mit vergleichbarer Affinität (Kumar U. et al. 1999). Allerdings zeigt SSTR5 eine ca. 10-fach höhere Affinität für SST-28 im Vergleich zu SST-14 (Kumar U. et al. 1999).

Der intrazelluläre Signalweg der SSTRs ist komplex. Am Anfang binden SST oder SST-Analoga an die unterschiedlichen SSTRs. SSTRs gehören zu der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Patel Y. C. 1999; Kumar U. et al. 1999). Sie bestehen morphologisch aus 7 transmembranösen Domänen, die durch 3 extra- und 3 intrazellulären Schleifen miteinander verbunden sind (Abb. 3). Außerdem besitzen sie ein extrazelluläres Amino (N)-Terminus und einen intrazellulären Carboxyl (C)-Terminus.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung von SSTR (Lamberts et al 1996).

Die Rezeptoren kommen als Monomere vor. Sie haben jedoch auch die Fähigkeit zu dimerisieren (Homo- oder Heterodimerisierung, z. B. SSTR2, SSTR3 und SSTR5). Als Konsequenzen der Homo- oder Heterodimerisierung ist sowohl die Aktivierung als auch die Inhibition der Rezeptoraktivität beschrieben (Rocheville M. et al. 2000a/b; Patel Y. C. et al. 2002). Weitere Konsequenzen der Rezeptor-SST-Interaktion besteht in die Aktivierung von intrazellulären Signalmolekülen wie cAMP, Calcium- und Kalium-Ionen-Austauscher,

Phospholipase C, Adenylatcyclase oder Tyrosinphosphatase (Patel Y. C. 1999). Über MAP-Kinasen werden die Effekte von SST und Agonisten auf die Proliferation von Zellen vermittelt. Über die Steuerung von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen kann die Sekretion und Proliferation der Zellen reguliert werden. Für alle Rezeptorsubtypen wurden Liganden entwickelt, die selektiv die Rezeptoren binden. Das war die Grundlage für die pharmakologische Charakterisierung der individuellen SSTRs. Sowohl peptidgerge als auch nicht-peptidgerge Agonisten und Antagonisten für SSTr wurden beschrieben. Einige davon (z. B. Octreotid oder Pasireotid) sind mittlerweile fest in den klinischen Alltag etabliert.

## 1.8 SSTr-Verteilung im Körper

SSTRs sind im gesamten Körper verteilt jedoch in unterschiedlichen Konzentrationen. Sie sind anzutreffen im Gehirn, Darm, in der Hypophyse, im endokrinen und exokrinen Pankreas, in der Schilddrüse, Lunge, im Darm, in den Nieren und Nebennieren sowie in verschiedenen Tumorzellen (Patel Y. C. 1999; Kumar U. et al. 1999; Barnett P. 2003). Die höchste Dichte wurde jedoch im ZNS sowie in endokrinen Organen beschrieben. Im endokrinen Pankreas werden alle fünf SSTRs vorgefunden. Die höchste Expression von SSTr5 und SSTr-1 ist auf Insulin-produzierenden Beta- Zellen zu finden, während Glukagon- produzierende Zellen vor allem SSTr2 exprimieren. In der Hypophyse wurden bisher alle SSTRs in unterschiedlicher Verteilungsdichte beschrieben.

SSTR-Subtyp:	Lokalisation:
SSTR1	Gehirn, Hypophyse, Magen, Leber, Pankreas (Beta-Zellen), Nieren, Lunge, Darm, Milz, Thymus, Uterus
SSTR2	Gehirn, Hypophyse, Magen, Leber, Pankreas (Alpha-Zellen), Nieren, Lunge, Darm, Milz, Thymus, Uterus
SSTR3	Gehirn, Hypophyse, Magen, Darm, Milz, Thymus
SSTR4	Gehirn, Hypophyse, Magen, Pankreas, Lunge, Darm, Milz, Uterus
SSTR5	Gehirn, Hypophyse, Magen, Pankreas (Beta-, Delta-Zellen), Lunge, Darm, Milz, Uterus, Plazenta, Nebennieren

**Abbildung 4:** Verteilungsmuster der SSTRs (basierend auf Barnett P. 2003).

## 1.9 Physiologische Funktionen von SSTRs

SSTRs sind an multiplen zellulären Prozessen beteiligt. Die Bindung des Liganden an die SSTRs führt u. a. zu einer Hemmung der Sekretion von verschiedenen Verdauungsenzymen wie Gastrin und Sekretin (Patel Y. C. 1999; Kumar U. et al. 2010). Weiterhin hemmen SSTRs die Freisetzung von Insulin und Glukagon (Patel Y. C. 1999). Außerdem wird die Bildung des Wachstumshormons Somatotropin in der Hypophyse herabgesetzt. Als Folge der unterschiedlich hemmenden Eigenschaften kann SST eine Inhibition des Zellwachstums bewirken. Darüber hinaus moduliert SST die Kontraktion von glatten Muskelzellen. Im klinischen Alltag sind SSTRs etablierte Zielmoleküle für die Behandlung von Erkrankungen, die mit einer inadäquat gesteigerten hormonellen Produktion einhergehen. Darüber hinaus spielen sie eine wichtige Rolle in der Therapie von neuroendokrinen Tumoren (Modlin I. M. et al. 2009). Octreotid oder Pasireotid (peptiderges Agonist für SSTR1–3, sowie SSTR5) werden in der Therapie des M. Cushing, Akromegalie und neuroendokrinen Tumoren eingesetzt. Einer Beobachtung zufolge nehmen die Patienten unter Therapie mit dem SST-Agonisten Octreotid an Gewicht ab (Lustig R. H. et al. 2002). Eine der potentiellen Mechanismen ist sicherlich die Hemmung des anabolen Hormons Insulins. Allerdings spielen möglicherweise auch andere Wirkungen von SSTRs dabei eine Rolle.

## 1.10 Zielsetzung/Fragestellung

Angesichts der Tatsache, dass exogenes und endogenes SST eine inhibitorische Eigenschaft auf die Regulation der Sekretion von Insulin zeigt und einen potentiellen Einfluss auf den Gewichtsverlauf hat, habe ich die Effekte von SST auf die Insulinneuproduktion und auf die Fettzellen untersucht. Da die Effekte von SST auf die Gewichtsentwicklung möglicherweise indirekt über die Beeinflussung der Hormonfreisetzung aus endokrinen Geweben sowie über die Regulation des enteralen Nervensystems (Appetitzentrum im Hypothalamus) vermittelt sein können, habe ich den direkten Effekt von SST auf die Adipozyten in vitro charakterisiert. Die Untersuchungen wurden in vitro an etablierten Zelllinien durchgeführt.

## 2 Methodik, Material und Reagenzien

### 2.1 Geräte

Autoklav	<i>Webeco, Selmsdorf</i>
Blotting Gerät	<i>Biometra, Göttingen</i>
Brutschrank Water-Jacketed Incubator	<i>Labortect Labor-Technik-Göttingen</i>
Confocal Laser Scanning Mikroskop – FV500	<i>Olympus, Hamburg</i>
Digitalkamera AxioCam HRc	<i>Zeiss, Oberkochen</i>
Elektrophorese Kammer	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)	<i>Becton Dickinson, Heidelberg</i>
Fastblot Blotting Gerät	<i>Biometra, Göttingen</i>
Filterflaschen	<i>Nunc, Langenselbold</i>
Filterpapiere	<i>Schleicher &amp; Schuell, Dassel</i>
Fluoreszenz- mikroskop FluoView Confocal Laser	<i>Olympus, Hamburg</i>
Flüssig-Scintillationszähler 1409	<i>Wallack, Freiburg</i>
Gammazähler 1470 WIZARD Automatic	<i>Wallac (Perkin Elmer), Rodgau</i>
Gefrierschrank (-20 °C) economic-super	<i>Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe</i>
Gefrierschrank -85 °C Ultra Low Freeze	<i>New Brunswick Scientific, Hamburg</i>
Kühlschrank (4-8 °C) profi line	<i>Liebherr, Biberach an der Riss</i>
Kühlzentrifuge Cryofuge 5000	<i>Heraeus, Hanau</i>
LightCycler 2.0 Instrument	<i>Roche, Mannheim</i>
Luminometer MicroLumat Plus LB 96V	<i>Berthold Technologies, Bad Wildbad</i>
Magnetrührer IkaMag RCT	<i>Ika, Staufen</i>
Mikroskop Ck2	<i>Olympus, Hamburg</i>
Mikroskop Axiophot	<i>Zeiss, Oberkochen</i>
Mikrozentrifuge 5417R	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Mini-Protean® Tetra Electrophoresis System	<i>Bio-Rad GmbH, München</i>
Multiwellplatten (6, 12, 24, 96)	<i>Becton Dickinson, Heidelberg</i>
Neubauer Zählkammer	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Nitrozellulosemembran Trans-Blot Transfer	<i>Bio-Rad GmbH, München</i>

Objektträger	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
pH Meter 761 Calimatic	<i>Knick, Berlin</i>
Pipettenspitzen (5, 10, 25 ml)	<i>Becton Dickinsen, Heidelberg</i>
Pipettenspitzen (steril) mit Filter (FT200, FT10E)	<i>Greiner Bio-One, Frickenhausen</i>
Reagenzgläser (12 x 75 mm)	<i>Fisher Scientific, Schwerte</i>
Röntgenfilm Cronex 5	<i>Agfa HealthCare, Köln</i>
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine Protec	<i>Siemens AG, Erlangen</i>
Semi Dry Blotter	<i>Bio-Rad GmbH, München</i>
Schüttler Polymax 1040	<i>Heidolph, Schwabach</i>
Standzentrifuge Sigma 6K10	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Sterilwerkbank/Bench Lamin Air HB 2448	<i>Heraeus GmbH, Hanau</i>
Zellkulturflaschen steril (75cm <sup>2</sup> , 175cm <sup>2</sup> )	<i>Becton Dickinsen, Heidelberg</i>
Thermocycler TGradient	<i>Biometra GmbH, Göttingen</i>
Thermomixer compact	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Vortexer Relax top	<i>Heidolph, Schwabach</i>
Wasserbad	<i>GFL, Burgwedel</i>
Zellschaber 25cm	<i>Sarstedt, Nümbrecht</i>
Zentrifugenröhrchen (1,5 ml, 2 ml)	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
96-Wellplatte	<i>Nalge Nunc International (Thermo Fisher Scientific), Dreieich</i>

## 2.2 Chemikalien

Merck, Darmstadt	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
2-Deoxy-D-Glukose	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
2-Mercaptoethanol	<i>Gibco Invitrogen, Darmstadt</i>
30% Acrylamide-Mix	<i>Bio-Rad GmbH, München</i>
4% Paraformaldehyd	<i>Herbeta, Berlin</i>
99,5% Ethanol	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
6-Amino-hexansäure	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Albumin vom Rinderserum (BSA)	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Ammoniumpersulfat (APS)	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>

$\beta$ -Mercaptoethanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Blotting Grade Blocker	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
D-(+)-Glucose Lösung (45 %)	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Dexamethason	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	<i>Gibco Invitrogen, Darmstadt</i>
EASYpack Protease Inhibitor	<i>Roche, Mannheim</i>
EDTA	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Ethanol (EtOH)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Fetales Kälberserum (FKS)	<i>Gibco Invitrogen, Darmstadt</i>
Formalin	<i>Merck, Darmstadt</i>
Glycerin	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Glycerol	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
HEPES 1M	<i>Gibco Invitrogen, Darmstadt</i>
Insulin	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Isobutylmethylxanthin (IBMX)	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Isopropanol	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Kaliumchlorid (KCl)	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Kaliumhydroxid (KOH)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Laemmli Sample Buffer	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Methanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumchlorid (NaCl)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	<i>Merck, Darmstadt</i>
Oil Red O Stocklösung O-0625	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Optiphase Supermix	<i>Wallac (Perkin Elmer), Rodgau</i>
PBS-Dulbecco	<i>Biochrom AG, Berlin</i>
Penicillin-Streptomycin	<i>Biochrom AG, Berlin</i>
Ponceau S Solution	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Precision Plus Protein Standards	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>

RIPA Puffer	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Salzsäure (HCl)	<i>Merck, Darmstadt</i>
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	<i>Serva, Heidelberg</i>
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>
Tris-EDTA Puffer	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Tris-HCl	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Trypan Blue Färbelösung 0,4%	<i>Gibco Invitrogen, Darmstadt</i>
Trypsin-EDTA	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching</i>
Tween 20	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	<i>Carl Roth, Karlsruhe</i>
Wasser	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>

### 2.3 Lösungen und Puffer

PBS-Tween	<i>900 ml destilliertes Wasser + 98 ml 10x PBS + 2 ml Tween-20</i>
Milchblockierlösung	<i>PBS-Tween + 5 % Blotting Grade Blocker</i>
AI-Puffer	<i>36,34 g TRIS + 200 ml Methanol (MeOH) + Wasser (Gesamtvolumen 1 Liter)</i>
All-Puffer	<i>3,02 g TRIS + 200 ml Methanol (MeOH) + Wasser (Gesamtvolumen 1 Liter)</i>
K-Puffer	<i>5,24 g 6-Aminohexansäure + 200 ml Methanol (MeOH) + Wasser (Gesamtvolumen 1 Liter)</i>
Stripping-Puffer (pH 6,7)	<i>3,79 g TRIS (M=121,13 g/mol) 62,5 mM in 500 ml Wasser + 50 ml 10 % SDS Stammlösung + 3,9 ml <math>\beta</math>-Mercaptoethanol 100 mM (M=78,13 g/mol) + 400 ml destilliertes Wasser</i>

## 2.4 Kit-Systeme

Amersham ECLTM Western Blotting	GE Healthcare, Freiburg
Colorimetric Triglyceride Kit	Cypress Diagnostics, Langdorp, Belgien
Free Glycerol Determination Kit	Sigma-Aldrich, Steinheim
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR® Green I	Roche, Mannheim
LightCycler® TaqMan® Master	Roche, Mannheim
Pierce BCATM Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Dreieich
ProteoJETTM Membrane Protein Extraction Kit	Fermentas Life Science, St. Leon-Rot
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden

## 2.5 Primer

Primers zur Bestimmung der Rezeptorexpression von IGF-1-Rezeptor, IGF-2-Rezeptor und Insulinrezeptor auf INS-1-Zellen nach Inkubation mit SST (r = Ratte, InsR = Insulinrezeptor).

r-IGF-1	Sense: <i>aaaaccatcgattctgtgacg</i>	Antisense: <i>ggttcttcaggaaggacaagg</i>
r-IGF-2	Sense: <i>caggacagtgaggatga</i>	Antisense: <i>tttggttgagggtcctggc</i>
r-InsR	Sense: <i>cctactgctatgggctccg</i>	Antisense: <i>aggatctgcagatggccctc</i>

Primers für die Messung der SSTR-Expression auf Adipozyten. Spezies: Ratte.

SSTR1	Sense: <i>tctggatctcaccttcacct</i>	Antisense: <i>ccatcagtttctgttgctgt</i>
SSTR2	Sense: <i>gaggcctttccctagagtt</i>	Antisense: <i>caccgtaacgctgtcctt</i>
SSTR3	Sense: <i>tccaagaagccaccagctaa</i>	Antisense: <i>aacatcgaaggagcattga</i>
SSTR4	Sense: <i>tctgcatcgtcctggcttt</i>	Antisense: <i>cttggccagttcctgtttcc</i>
SSTR5	Sense: <i>tggtctttggaaggtgaaag</i>	Antisense: <i>tgtccacagtcggaatggt</i>
beta-Actin (r)	Sense: <i>agggaaatcgtgcgtgac</i>	Antisense: <i>cgctcattgccgatagt</i>
Proinsulin (r)	Sense: <i>agaccatcagcaagcaggtc</i>	Antisense: <i>cttgggctcccagaggac</i>



## 2.6 Antikörper

Antikörper	Herkunft	Firma	Verdünnung
Adiponectin	<i>Kaninchen</i>	<i>Abcam, Cambridge, England</i>	<i>1:1000</i>
AKT	<i>Kaninchen</i>	<i>Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA</i>	<i>1:1000</i>
$\beta$ -Aktin	<i>Maus</i>	<i>Sigma Aldrich, Steinheim</i>	<i>1:5000</i>
FoxO1	<i>Kaninchen</i>	<i>Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA</i>	<i>1:1000</i>
pFoxO1 (Ser 256)	<i>Kaninchen</i>	<i>Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA</i>	<i>1:1000</i>
GLUT4	<i>Kaninchen</i>	<i>Abcam, Cambridge, England</i>	<i>1:2500</i>
p-AKT (Ser473)	<i>Kaninchen</i>	<i>Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA</i>	<i>1:1000</i>
p-AKT (Thr308)	<i>Kaninchen</i>	<i>Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA</i>	<i>1:1000</i>
PDK1	<i>Kaninchen</i>	<i>Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA</i>	<i>1:1000</i>
p-PDK1 (Ser241)	<i>Kaninchen</i>	<i>Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA</i>	<i>1:1000</i>
p-85	<i>Kaninchen</i>	<i>Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA</i>	<i>1:1000</i>
p-85 (Tyr458)	<i>Kaninchen</i>	<i>Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA</i>	<i>1:1000</i>
Anti-Rabbit IgG, HRP-linked	<i>Ziege</i>	<i>Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA</i>	<i>1:5000</i>
Anti-Mouse IgG, HRP-linked	<i>Pferd</i>	<i>Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA</i>	<i>1:5000</i>
Anti-Rabbit Cy3	<i>Ziege</i>	<i>Dianova, Hamburg</i>	<i>1:150</i>
Anti-Goat IgG, HRP-linked	<i>Esel</i>	<i>Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA</i>	<i>1:5000</i>

## 2.7 Zellen

Die INS-1E Zellen wurden unserer Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Pierre Maechler, Universität Genf, Schweiz, zur Verfügung gestellt.

Die 3T3-L1 Zelllinie (Maus) wurden von der Firma ATCC (Manassas, VA, USA) käuflich erworben.

## 2.8 Software

GraphPad Prism 5	<i>GraphPad Software, La Jolla, CA, USA</i>
LightCycler® Software Version 4.5	<i>Roche, Mannheim</i>
MultiCalc® Version 3.6	<i>Wallac (Perkin Elmer), Rodgau</i>
Quantity One® 1-D Analysis Software	<i>Bio-Rad Laboratories GmbH, München</i>

## 2.9 Isolation von Adipozyten der Ratte

Primäre Adipozyten wurden aus dem epididymalen Fettgewebe (Viszeralfett) der männlichen adulten Wistar Ratten isoliert. Das Gewebe wurde zunächst zerkleinert und dann in KRBH-Puffer zweimal gewaschen. Das Gewebe wurde anschließend von Blutgefäßen gereinigt, getrocknet, weiter zerkleinert und in Falcon-Röhrchen überführt. Das fragmentierte Gewebe wurde nun in KRBH für 45 Minuten, bei 37 °C in einem Wasserbad unter ständiger Agitation inkubiert um den Gewebeverdau zu erzielen. KRBH enthielt 3 mg/ml Kollagenase Typ II, 3% (Gew./Vol.) BSA und 5 mM Glukose. Anschließend wurden die isolierten Zellen durch ein Nylonnetz (250 µm) gefiltert. Dadurch konnten größere unverdaute Gewebestücke und restliche Blutgefäße abgetrennt werden. Danach erfolgte das erneute Waschen der isolierten Zellen mit KRBH ohne Zusatz von Kollagenase. Die isolierten Adipozyten wurden in einer Bürker-Türk-Zählkammer gezählt.

## 2.10 3T3-L1 Zellkultur und Differenzierung

3T3-L1 Fibroblasten (ATCC) wurden konstant bei 37 °C in DMEM gehalten, das 10% FCS, 100 kU/l Penicillin sowie 100 mg/l Streptomycin beinhaltet (Standardinkubationsmedium). Die Zellen wurden im Brutschrank bei 5% CO<sub>2</sub> und 95% O<sub>2</sub> gelagert. Zellen 1:6 bei einer Konfluenz von 60% geteilt. Für die Differenzierung ließ man die Zellen zu 100% konfluent wachsen. Danach erfolgte ein Mediumwechsel (Standardmedium), (Versuchstag -2). Nach 2 Tagen wurde das Standardinkubationsmedium gegen ein Differenzierungsmedium ausgetauscht (Versuchstag 0). Dieses beinhaltet 0,5 mM Isobutylmethylxanthin (IBMX), 0,25 µM Dexamethason sowie 10 mg/ml Insulin. Ein erneuter Mediumwechsel erfolgte nach weiteren 2 Tagen. Dieses Medium bestand aus dem Standardinkubationsmedium, welches zusätzlich Insulin in einer Konzentration von 1 µg/ml beinhaltet. Die Differenzierung war nach 6 – 10 Tagen erfolgreich. Die Beurteilung der Differenzierung erfolgte visuell unter dem Lichtmikroskop sowie durch Quantifizierung des adipocyte fatty acid-binding protein (aP2). Der Anstieg von aP2 >100-fach gegenüber undifferenzierten 3T3-L1 Fibroblasten deutete auf eine hinreichende Differenzierung zu reifen Adipozyten hin.

## 2.11 Kultivierung der INS-1E Zellen

Die INS-1E Zellen wurden unserer Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Pierre Maechler, Universität Genf, Schweiz, zur Verfügung gestellt. INS-1E Zellen wurden nach der Methode von Mergler und Strowski (Mergler et al. 2008) kultiviert. Alle Medien wurden zunächst im Wasserbad auf 37° Celsius erwärmt. Für die Kultivierung wurde RPMI1640-Medium verwendet. Das Medium enthielt außerdem 5% fetales Kälberserum, 1% Streptomycin/Penicillin sowie L-Glutamin. INS-1E Zellen wurden im Brutschrank bei 37° Celsius, in einem Gasgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Die Teilung der Zellen erfolgte je nach Konfluenz zweimal pro Woche in einem Verhältnis von 1:5 – 1:8. Dafür wurde zunächst das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen im Brutschrank mit Trypsin-EDTA für 5 Minuten bei 37° Celsius. Nachdem sich die Zellen vom Boden gelöst haben, wurde das Gemisch in ein Falconröhrchen mit Kulturmedium überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 800 RPM für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde danach in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Alle Schritte erfolgten steril unter der Zellwerkbank.

## 2.12 Bestimmung der Triglyceride in Adipozyten

Zunächst erfolgte eine Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten in 12-Well-Platten. Anschließend wurden die Adipozyten mit serumfreien DMEM-Medium über Nacht inkubiert. Eine weitere Inkubation erfolgte danach mit serumfreien DMEM-Medium und den Testpeptiden für weitere 48 Stunden. Das Medium wurde entfernt und die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen. Pro Well wurden jeweils 100 µl Triglyceride Assay Puffer hinzugegeben. Der Puffer besteht aus 50mM Tris HCL und 1 mM EDTA. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der 12-Well Platten gelöst und in Falconröhrchen überführt. Anschließend wurden diese mit Ultraschall für 10 Sekunden bei 70 Watt behandelt. 10 µl des Gemisches wurde in einen Well einer 96-Well-Platte überführt. Der Triglyceridgehalt wurde mit Hilfe des Colorimetric Triglyceride Kit (SIGMA-Aldrich) bestimmt. Dabei werden Triglyceride zunächst gespalten. Das dabei entstandene Glycerol wird nun mithilfe der Glycerolkinase zu Glycerol-3-Phosphat phosphoryliert. Glycerol-3-Phosphat wird oxidiert unter Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reagiert mit 4 Aminoantipyrin + P-Chlorophenol. Dabei entsteht ein roter Farbstoff. Die Farbintensität ist direkt proportional zum Triglyceridgehalt der Zellen und kann photometrisch gemessen werden. Zur Messung wurden 10 µl des Zellgemisches und 10 µl der Standardlösung in ein Well überführt. Weiterhin wurde 90 µl Arbeitslösung in jedes Well hinzugegeben. Die Messung erfolgte in einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 505 nm. Zur Quantifizierung des Triglyceridgehaltes (mg/dl) wurde folgende Berechnung genutzt:

$$\frac{\text{Absorption Zellgemisch}}{\text{Absorption Standardlösung}} \times \text{Standardkonzentration}$$

## 2.13 Oil red O Methode zur Visualisierung der Triglyceride in Adipozyten

Oil red O ist ein fettlöslicher Azofarbstoff mit rötlicher Färbung. Er wird zur Anfärbung von Triglyceriden in Zellen verwendet. Über Nacht wurden die Adipozyten in 12-well-Platten in einem serumfreien DMEM inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 10% Formalin für 10 Minuten fixiert. Danach wurden die Zellen mit 60% Isopropanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Zellen wurden an-

schließlich mit Oil red O für 10 Minuten versetzt. Der Überschuss von Oil red O wurde danach mit Wasser entfernt. Das gebundenen Oil red O blieb in den Zellen haften. Anschließend wurden die gefärbten Zellen die unter dem Axiophot Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Germany) bei einer 20-fachen Vergrößerung fotografiert. Zur Quantifizierung wurde Oil red O von den Zellen mit 100% Isopropanol ausgewaschen. Die Absorption des Eluates wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 500 nm gegen Isopropanol bestimmt.

## 2.14 Lipolyse

Über Nacht wurden die 3T3-L1 Adipozyten in DMEM (0,1% BSA) mit den Testsubstanzen für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium gesammelt und bei 800 RPM für 10 Minuten zentrifugiert. Freies Glycerol wurde aus dem Überstand gemessen mit dem Free Glycerol Determination Kit von Sigma-Aldrich.

## 2.15 Lipogenese

Die Zellen wurden zunächst in KRBH (pH: 7,4) inkubiert. Außerdem wurde 3mM Glucose, 0,5  $\mu$ Ci [U-14C] Glucose, 3% BSA und die zu testenden Peptiden hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 90 Minuten in einem Wasserbad bei 37 °C geschwenkt. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe der Dole's Reaktionsmischung (Dole und Meinertz 1960). Anschließend wurden Heptan und Wasser hinzugefügt und die Proben erneut im Wasserbad geschwenkt. Der lipidhaltige Überstand wurde in ein Szintillationsgefäß überführt. Danach erfolgte die Messung der Radioaktivität in einem Beta-Counter.

## 2.16 Glukoseaufnahme in die Zellen

Um die Glukoseaufnahme zu bestimmen wurde 2-Deoxyglukose verwendet. 2-Deoxyglukose wird über die Glukosetransporter aufgenommen und verbleibt dort, ohne verstoffwechselt zu werden. Dadurch kann die Glukoseaufnahme der Zellen bestimmt werden. INS-1E Zellen wurden in 24-well Platten ausgesät und über Nacht in serum-

freiem DMEM inkubiert. Danach wurden diese mit PBS gewaschen und in KRBH ohne Glukose für 15 Minuten inkubiert (0,1% BSA ohne Fettsäuren). Anschließend wurde pro Well 250 ml eines radioaktiven Gemisches bestehend aus 0,5  $\mu\text{Ci}$  2-Deoxy-D [2,6- $^3\text{H}$ ] Glukose sowie 0,1 mM 2-Deoxy-Glukose zugeführt und die Testsubstanzen. Die Reaktion wurde nach 5 Minuten durch die Zugabe von 20  $\mu\text{M}$  Cytochalasin gestoppt. Danach wurde das Medium zügig entfernt und mit eisgekühltem PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 0,1% SDS lysiert. Die Überstände der Zellysate wurden nun zur flüssigen Szintillation und zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet. 350  $\mu\text{l}$  der Zellysate wurden in Scintillationsgefäße überführt. Diese enthielten 3 ml Optiphase SuperMix der Firma Wallac. Die Messung der Radiaktivität der 2-Deoxy-D [2,6  $^3\text{H}$ ] Glukose erfolgte in einem Flüssig-Scintillationszähler für 1 Minute. Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde das BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) verwendet.

## 2.17 Western Blot

Die Western Blot Methode wurde durchgeführt mit Hilfe des Mini-Protean® Tetra Electrophoresis System von Bio-Rad Laboratories GmbH. Es wurde zunächst das Trenngel sowie das Sammelgel hergestellt. Das aufgebaute Blotting-Gerät wurde mit Laufpuffer befüllt. Die Proteinlysate wurden mit Laemli-Sample-Puffer versetzt. 10  $\mu\text{l}$  Proteinlysate wurden in die Taschen des Sammelgels übertragen, wobei die erste Tasche ein Protein-Standard beinhaltete. So war es möglich, die Proteine nach Gewicht zu detektieren. Das Blotting-Gerät wurde nun mit Kathodenpuffer weiter befüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst bei 80 Volt für ca. 10 Minuten und anschließend bei 150 – 180 Volt für 90 Minuten. Danach wurden die Gele aus dem Blotting-Gerät entfernt und in K-Puffer gelegt. Zur Übertragung der Proteine auf eine Membran wurde das Trans-Blot® Transfer Medium Nitrocellulose Membrane von Bio-Rad Laboratories verwendet. Zur Vorbereitung wurden 2 Nitrocellulosemembrane in AI-Puffer inkubiert und eine weitere Nitrocellulosemembran in AII-Puffer. Die Membranen wurden mit AII-Puffer befeuchtet, das Gel mit K-Puffer und zwei weitere Nitrocellulosemembrane mit K-Puffer. Alle Schichten wurden nun auf den Semi Dry Blotter gelegt. Die Übertragung erfolgte nun bei 300 Watt für 1 Stunde vom Gel auf die Membran. Danach wurden die Membranen mit den übertragenen Proteinen mit PBS-Tween gewaschen. Zum Sichtbarwerden der Proteine wurden die Membranen mit Ponceau S gefärbt. Um freie Bindungsstellen von Proteinen zu blockieren, wurden die Membranen mit einer 5% Milchpulverlösung für 30 Minuten auf dem Schwenker inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper

in 5% Milchpulverlösung verdünnt. Die Membranen wurden danach mit 10 ml der Antikörperlösung bei 4 °C, über Nacht, auf dem Schwenker inkubiert. Am Folgetag wurde der primäre Antikörper entfernt und die Membranen ausgiebig mit PBS-Tween gewaschen (3 x 10 Minuten). Danach erfolgte die Inkubation der Membranen mit dem sekundären Antikörper, der ebenfalls in 5% Milchpulverlösung verdünnt wurde. Die Membranen wurden anschließend mit 10 ml des sekundären Antikörpers für 1 Stunde auf dem Schwenker inkubiert. Nach Entfernen des sekundären Antikörpers erfolgte das erneute Waschen mit PBS-Tween. Zum Sichtbarwerden der Antikörperbindung wurde die Membran mit dem ECL-Kit von Amersham Biosciences, Freiburg, versetzt und auf einem Röntgenfilm gelegt. Die Entwicklung erfolgte mit der Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine Protec der Firma Siemens AG.

## 2.18 Quantitative real-time PCR

Bei der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion wurde ein Verfahren entwickelt mit dem man spezifische RNS sowohl nachweisen als auch vervielfältigt kann. Das Verfahren beruht auf die Polymerase Kettenreaktion, bei der DNS mit Hilfe der DNS-Polymerase vervielfältigt werden kann. Durch eine zusätzliche Reverse Transkriptase wird RNS zunächst in eine komplementäre DNS umgeschrieben. Am Anfang der Synthese wird ein Primer benötigt. Dies ist ein Oligonukleotid, der an die DNS bindet. Zu Beginn wird der DNS-Doppelstrang auf etwa 90 °C denaturiert. So kommt es zur Lösung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen und die Primer können sich anlagern. Die Bindung der Primer erfolgt durch Abkühlung der Temperatur auf 50 °C (Hybridisierung). Nun kann die DNS-Polymerase den komplementären DNS-Strang synthetisieren (Elongation). In unseren Versuchen wurde die RNS zunächst in komplementäre cDNS umgeschrieben. Dies geschah mit Hilfe der oben beschriebenen reversen Transkriptase SuperScript II (Invitrogen, Karlsruhe). Außerdem wurden Oligo-dT-Primer verwendet. Anschließend erfolgte die quantitative Echtzeit-PCR unter Verwendung eines ICycler PCR-Gerätes der Firma BioRad (Hercules, CA, USA). Dabei wurden weiterhin FAM-TAMRA-Taqman-Sonden benutzt (Primer und Sonden wurden bei Tibmol-Biol Berlin bestellt). Der Versuchsansatz erfolgte auf Eis und bestand aus 12,5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Roche, Branchburg, New Jersey, USA), 0,75 – 1,0 µl Primer und 0,2 – 0,5 µl FAM-markierte Sonde, 1 µl cDNS und 9,8 µl molekularbiologisches ultrareines Wasser. Die Reaktionsansätze hatten jeweils ein Gesamtvolumen von 25 µl und wurden in einem Zweifach Ansatz durchgeführt. Die PCR begann mit einer Startphase von 10 Minuten bei 98 °C. Anschließend erfolgte

die Denaturierung der cDNS bei 95 °C für 20 Sekunden gefolgt von der Bindung der Primer an die cDNS bei 60 °C für 15 Sekunden (Hybridisierung). Als dritter Schritt erfolgte die Synthese des komplementären Stranges zur DNS bei 72 °C für 15 Sekunden. Insgesamt durchläuft die PCR 36 Zyklen. Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wird eine Fluoreszenz-markierte Sonde verwendet, die mit der DNS-Vorlage hybridisiert und erst dann fluoresziert, wenn sie von der DNS-Polymerase verstoffwechselt wird. Für die Quantifizierung der cDNS-Menge wurde der Cycle Threshold genutzt. Mit dem Ct-Wert lässt sich ermitteln, wie viele Zyklen notwendig sind bis das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Für die Negativkontrolle wurde anstatt der cDNS-Vorlage Nuklease-freies PCR Wasser verwendet.

## 2.19 Statistik

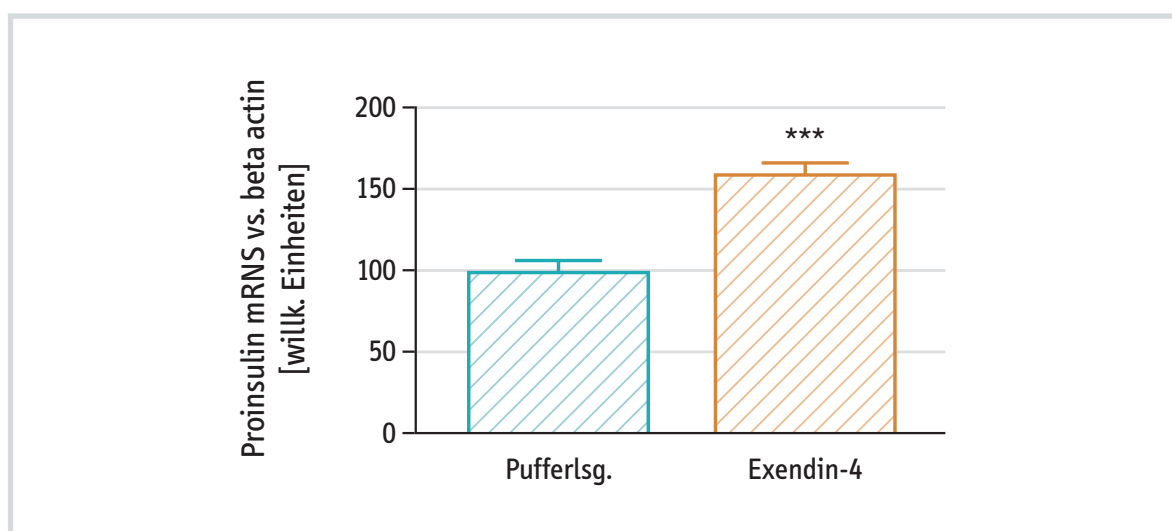
Für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software) verwendet. Dabei wurden die gewonnenen Daten als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Zur Bestimmung des Mittelwertes wurden mindestens 3 – 4 unabhängige Versuche durchgeführt. Zur Untersuchung signifikanter Unterschiede wurde der Student t-Test verwendet. Als statistisch signifikant wurden Werten mit einem  $p < 0,05$  festgelegt.



## 3 Effekte von SST auf die Funktion von Insulin-produzierenden Zellen (INS-1E)

### 3.1 Effekte von SST auf die Proinsulin mRNA Expression

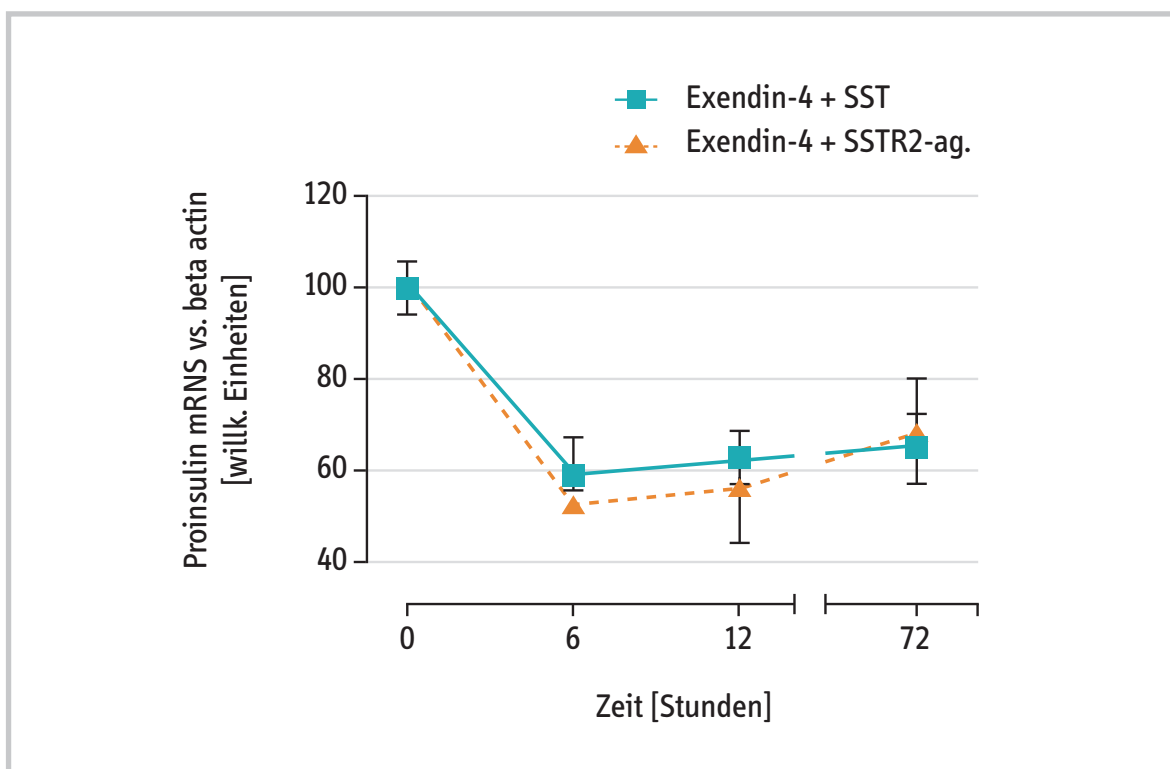
Die Synthese von Hormonen wie z. B. Insulin wird über die Steigerung der mRNA Expression getriggert. RNA wird dann ins Protein translatiert, wobei zunächst eine Vorstufe des fertigen Endproteins (z. B. Präproinsulin) entstehen kann. Am rauen endoplasmatischen Retikulum wird das Proteinhormon prozessiert und in Vesikeln gepackt. Das in Sekretionsgranula inkorporierte Proteinhormon wird dann aus den Zellen freigesetzt. SST hemmt die Fusion der Insulingranula mit der Zellmembran und unterbindet die Exozytose. INS-1E Zellen exprimieren Rezeptoren für SST (SSTR2 und SSTR3) (Singh V. et al. 2007). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass SST via SSTR2 und SSTR3 die Insulinsekretion in INS-1E Zellen innerhalb 1 – 2 Stunden hemmen kann. Allerdings wurden Wirkungen von SST auf die Insulinneusynthese nicht untersucht. In meinen Versuchen untersuchte ich daher zunächst die Wirkung von SST und eines SSTR2-selektiven Agonisten auf die Proinsulin-mRNA-Expression. Die Expression von Proinsulin-mRNA wurde mit Exendin-4 (GLP-1 Agonist) stimuliert. Exendin-4 steigerte die Proinsulin mRNA Expression in INS-1E Zellen um  $\approx 58 \pm 14$  Prozent im Vergleich zur basalen Transkription (Abb. 5).



**Abbildung 5:** Steigerung der Proinsulin mRNA Expression in INS-1E Zellen durch Exendin-4 (GLP-1 Agonist). Die Balken repräsentieren Messungen, die aus 3 – 4 unabhängigen Experimenten +/- SEM

ermittelt wurden. Als 100% (basale Sekretion) wurde die Konzentration des freigesetzten Insulins aus INS-1E Zellen definiert, die in einer Pufferlösung ohne Zugabe von Exendin-4 (10 mmol/l) inkubiert wurde. \*\*\* $p < 0,001$

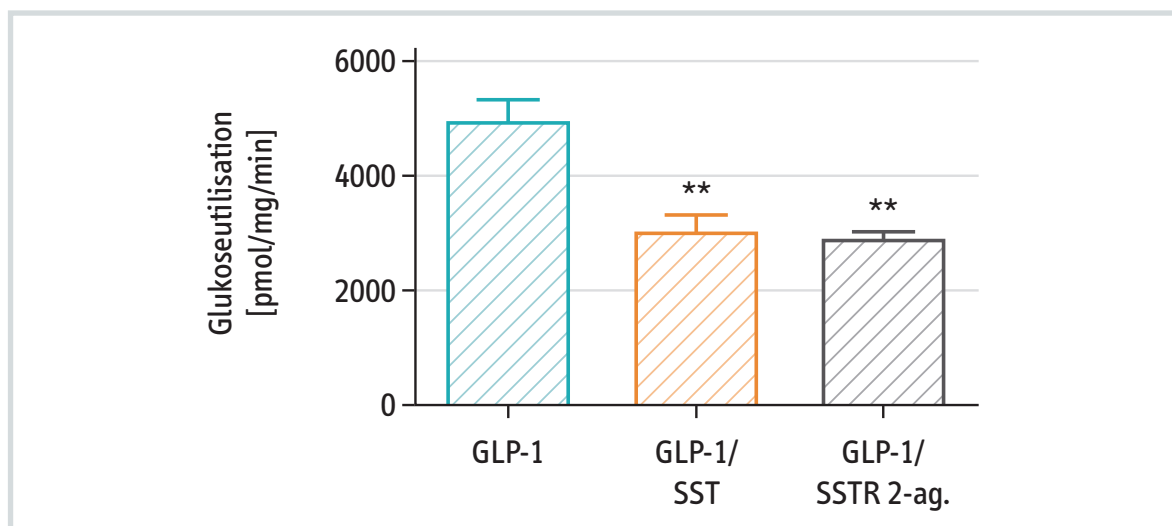
Sowohl SST (100 mmol/l) als auch ein SSTR2-selektiver Agonist (L-054,522, Firma Merck Sharp & Dohme, Rohrer SP et al., Science 1998), (100 mmol/l) hemmten zeitabhängig die Exendin-4 stimulierte Proinsulin-mRNS Expression (Abb. 6). Diese Hemmung war bereits nach 6 Stunden messbar und persistierte sogar bis zur gesamten Versuchsdauer von 72 Stunden (Abb. 6). Im Gegensatz dazu bewirkte ein SSTR3-selektiver Agonist (1,0 – 100 nmol/l) keine Hemmung der Proinsulin-mRNA Genexpression (Daten nicht dargestellt).



**Abbildung 6:** SST und ein SSTR2-Agonist reduzieren die Exendin-4-stimulierte Proinsulin-mRNS Expression in INS-1E Zellen. Zeitabhängiger Verlauf der Proinsulin-mRNS Expression. Als 100% wurde die Kontrolle definiert (Zellen inkubiert im Medium ohne Zusatz von SST oder SSTR-Agonisten). Messpunkte repräsentieren Mittelwerte +/- SEM ermittelt aus  $n = 3 - 4$  unabhängigen Experimenten. \*\* $p < 0,01$  vs Zeitpunkt Null.

### 3.2 Effekte von SST auf die Glukoseaufnahme in INS-1E Zellen und auf die Translokation des Glukosetransporters-2 (Glut2)

Die Aufnahme von Glukose in die pankreatischen Beta-Zellen induziert über mehrere metabolische Schritte eine Zelldepolarisation, was eine gesteigerte Insulinsekretion zur Folge hat. Die aktive Aufnahme von Glukose in die pankreatische Beta-Zelle wird u. a. durch den Glukosetransporter (Glut2) vermittelt. Dazu kommt es zu einer Translokation von Glut2 vom Zytoplasma zur Plasmamembran. Die Translokation des Glut2 Transporters bewirkt eine aktive Aufnahme von Glukose in die Zelle und nachfolgende Metabolisierung zu ATP. Um die Effekte von SST auf die Glukoseaufnahme der pankreatischen Beta-Zellen zu charakterisieren, wurden INS-1E Zellen mit GLP-1 (10 nmol/l) alleine und in Anwesenheit von zusätzlich SST und SSTR2-Agonisten (beide in einer Konzentration von 100 nml/l) in einem Medium inkubiert, das mit radioaktiver 2-Deoxy-3H-Glukose markiert wurde. Die (radioaktiv markierte) 2-Deoxyglukose wird nicht metabolisiert und daher lässt sich die Glukoseaufnahme in die Zellen ermitteln, indem die Menge der radioaktiven 2-Deoxy-3H-Glukose in den Zellen gemessen wird. SST und SSTR2-Agonist hemmten die GLP-1-stimulierte Glukoseaufnahme in INS-1E Zellen (Abb. 7a). SSTR2-Agonist reduzierte die GLP-1-stimulierte Expression von Glut-2 in der Plasmamembran von INS-1E Zellen (Abb. 7a). Zusammengefasst legen diese Daten nahe, dass SST die Glukose-Aufnahme in die Beta-Zellen sowie die Glukose-getriggerte Insulindegranulation hemmen kann.



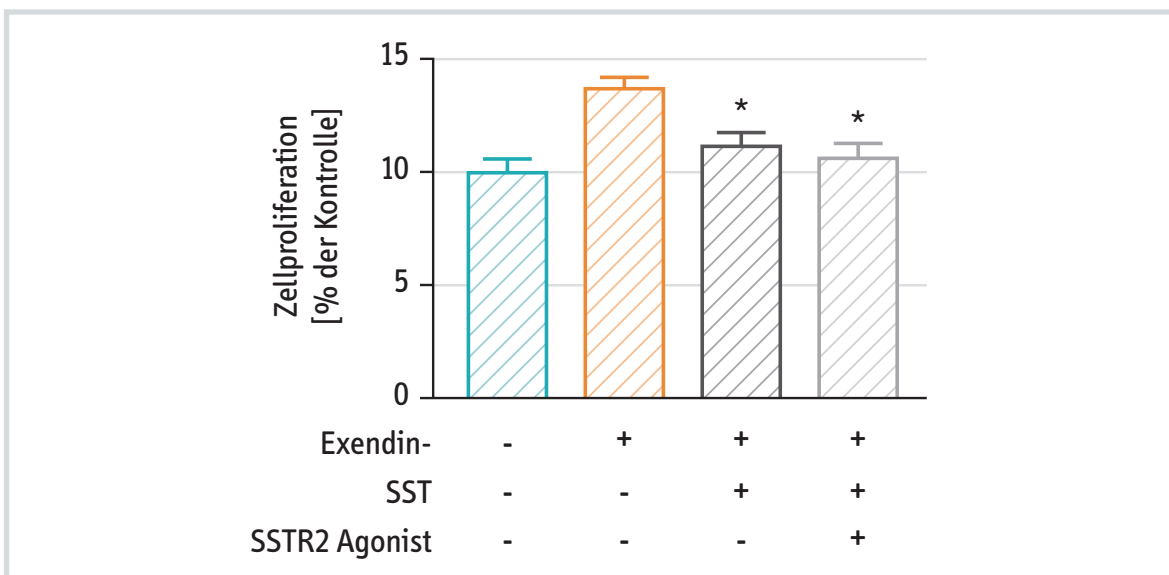
**Abbildung 7a:** Effekte von GLP-1, SST sowie ein SSTR2-selektiver Agonist auf die Aufnahme von Glukose in die INS-1E-Zellen (a). Messpunkte repräsentieren Mittelwerte +/- SEM ermittelt aus n = 3 – 4 unabhängigen Experimenten. \*\*p < 0,01 vs. GLP-1 behandelte Zellen.



**Abbildung 7b:** Western Blot zur Detektion des Glut-2 Proteins in Plasmamembranen der INS-1E Zellen nach Inkubation mit GLP-1 mit und ohne SSTR2-Agonist. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge erfolgte die Visualisierung der auf die Membran transferierten Proteine mit Ponceau Färbung.

### 3.3 Effekte von SST auf die INS-1E Zellproliferation

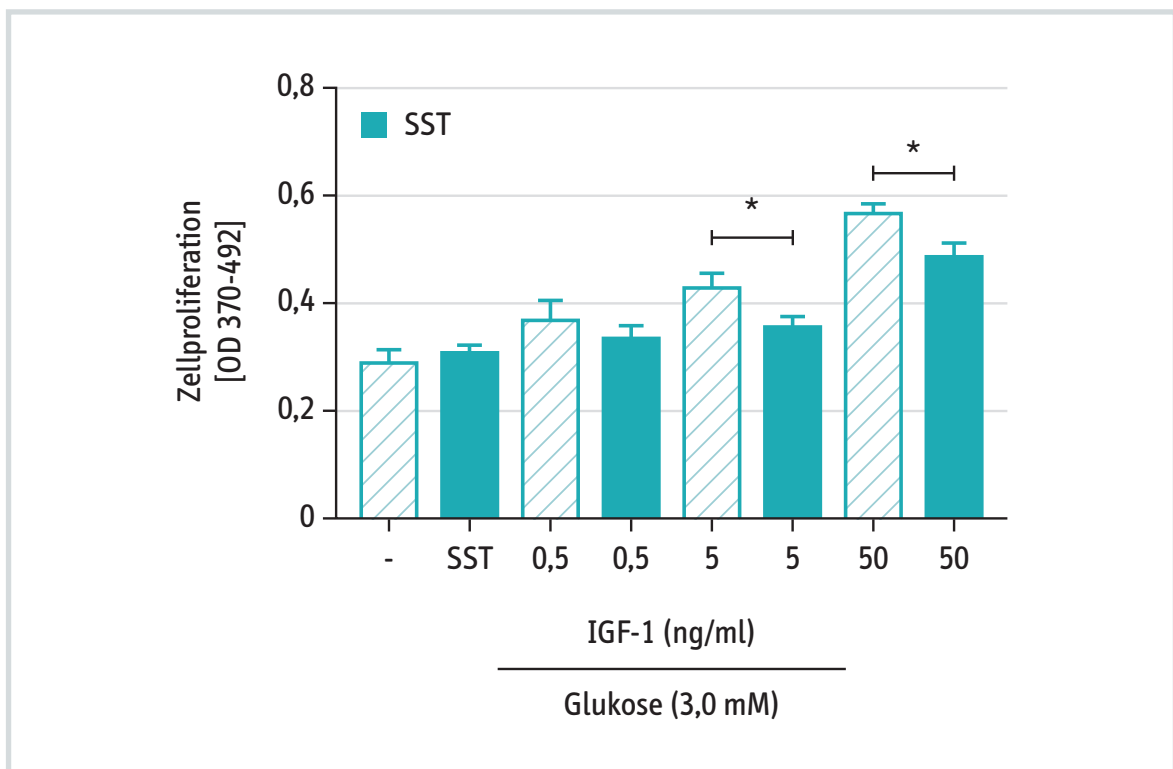
Es ist bekannt, dass GLP-1 die Proliferation der Beta-Zellen *in vitro* und *in vivo* stimulieren kann. SST hat antiproliferative Eigenschaften u. a. in bestimmten Tumorgewebe. Um zu testen, ob SST auch die Proliferation von Beta-Zellen regulieren kann, wurden INS-1E Zellen für einen Zeitraum von 48 Stunden mit 10 nmol/l Exendin-4 (GLP-1-Agonist, Positivkontrolle) und SST oder einem SSTR-2-selektiven Agonisten (jeweils 100 nmol/l) inkubiert. Es zeigte sich, dass Exendin-4 die Proliferation der INS-1E Zellen um  $\approx 38 \pm 12$  Prozent steigert. In Anwesenheit von SST oder eines SSTR2-selektiven Agonisten war der proliferative Effekt von Exendin-4 vollständig blockiert (Abb. 8).



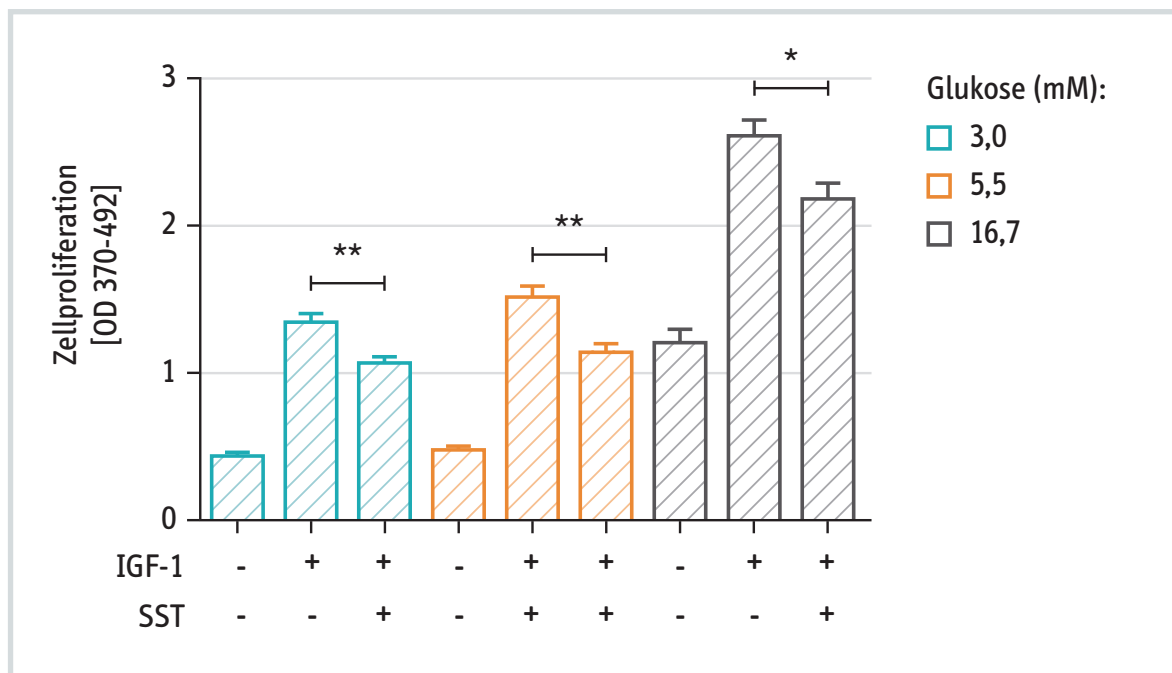
**Abbildung 8:** SST und ein SSTR2-selektiver Agonist hemmen die Exendin-4-stimulierte INS-1E Zellproliferation. Mittelwerte  $\pm$  SEM ermittelt aus  $n = 3 - 4$  unabhängigen Experimenten. \* $p < 0,05$  im Vergleich zu Exendin-4 behandelten Zellen.

Darüber hinaus charakterisierte ich die Effekte von SST auf die IGF-1-induzierte INS-1E-Zellproliferation. IGF-1 (0,5 ng/ml – 50 ng/ml) stimulierte konzentrationsabhängig die Proliferation von INS-1E Zellen, die in 3 mmol/l Glukose inkubiert waren (Abb. 9). SST hemmte die IGF-1 stimulierte INS-1E Zellproliferation (Abb. 9).

Als nächstes untersuchte ich, ob die Inhibition der IGF-1-stimulierten Proliferation von INS-1E Zellen durch SST von der Glukosekonzentration im Inkubationsmedium abhängt. Dazu wurden die Zellen in drei unterschiedlichen Konzentrationen von Glukose (3,0 mmol/l, 5,5 mmol/l und 16,7 mmol/l) inkubiert mit oder ohne IGF-1 oder SST. IGF-1 stimulierte die INS-1E Zellproliferation in allen Glukosekonzentrationen (Abb. 10). SST hemmte die IGF-1-stimulierte INS-1E Zellproliferation unabhängig von der Glukosekonzentration im Inkubationsmedium (Abb. 10).



**Abbildung 9:** Hemmung der IGF-1-stimulierten INS-1E Proliferation durch 100 nmol/l SST in 3 mmol/l glukosehaltigem Inkubationspuffer. IGF-1 wurde in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: 0,5 ng/ml, 5,0 ng/ml, 50 ng/ml. Mittelwerte +/- SEM ermittelt aus n = 3 – 4 unabhängigen Experimenten. \*p < 0,05



**Abbildung 10:** Glukoseunabhängige Stimulation der INS-1E Zellproliferation durch IGF1 (50 ng/ml). Hemmung der IGF-1 stimulierten Zellproliferation durch 100 nmol/l SST. Die Balkenfarben stellen die Konzentrationen an Glukose im Inkubationspuffer dar: blau: 3,0 mM, orange: 5,5 mM, grau: 16,7 mM. Mittelwert +/- SEM ermittelt aus n = 3 – 4 unabhängigen Experimenten. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 im Vergleich zu IGF-1-Stimulation.

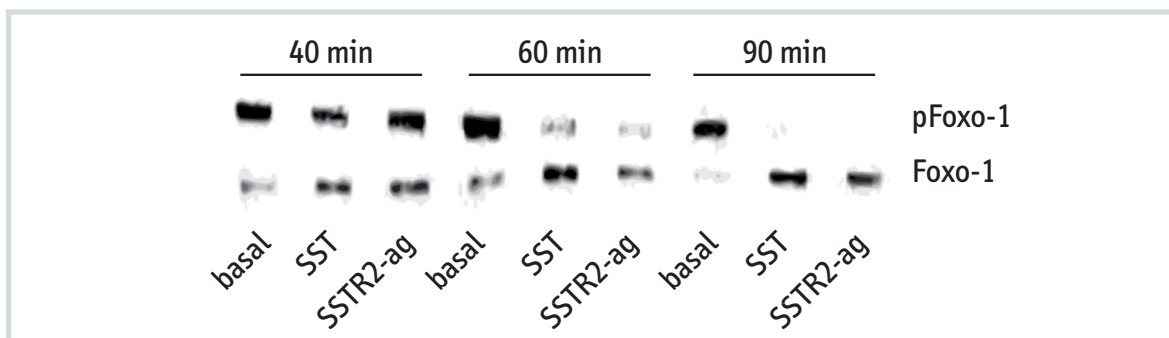
### 3.4 Effekte von SST auf die Expression des Transkriptionsfaktors Foxo-1 in INS-1E Zellen.

Die Proinsulin-Gentranskription wird u. a. durch den Transkriptionsfaktor Foxo-1 reguliert. Im nicht-phosphorylierten Zustand supprimiert Foxo-1 im Nukleus die Proinsulin-Gentranskription. Die Phosphorylierung von Foxo-1 bewirkt eine Translokation des Transkriptionsfaktors aus dem Nukleus ins Zytoplasma. Infolgedessen wird die Proinsulin-Gentranskription angestoßen.

Darüber hinaus kontrolliert Foxo-1 über den gleichen Mechanismus die Beta-Zellmasse, wobei dieser Effekt noch über PDX-1 vermittelt wird. Über unterschiedliche Zeiträume wurden INS-1E Zellen mit oder ohne SST oder SSTR2-Agonisten (jeweils in einer Konzentration von 100 nmol/l) in einem serumfreien Medium versetzt. Aus den Zellen oder aus den nukleären Zellkompartimenten wurden Gesamtproteine isoliert und deren Proteinproduktion/Phosphorylierung mittels Western Blot Analyse gemessen.

Sowohl SST als auch der SSTR2-selektive Agonist reduzierten zeitabhängig die Phosphorylierung von Foxo-1. Dieser Effekt war bereits nach 60 Minuten erkennbar und nach 90 Minuten persistierend (Abb. 11). Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Zellkernfraktion der INS-1E Zellen ein komplementärer Anstieg der Foxo-1 Proteine nach Inkubation mit SST oder SSTR2-selektiven Agonisten.

Die Phosphorylierung und nukleäre Expulsion von Foxo-1 erfolgt via Proteinkinase-B (Akt). Dieser Mechanismus wurde bereits für die GLP-1 induzierte Proliferation und Protektion von Beta-Zellen gegen Apoptose gezeigt (Buteau J. et al. 2006). Da SST die Phosphorylierung von Foxo-1 hemmte, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt möglicherweise mit der Phosphorylierung/Aktivierung von Akt korreliert. Das als Positivkontrolle verwendete GLP-1 (10 nmol/l) stimulierte die Phosphorylierung von Akt am Serin-Rest bereits nach 15 Minuten. SST hemmte die GLP-1-stimulierte Phosphorylierung von Akt in INS-1E Zellen. Das als Kontrolle gemessene gesamt Akt-Protein war in allen Testgruppen vergleichbar. Diese Daten suggerieren, dass SST die Foxo-1 Phosphorylierung (Inaktivierung) möglicherweise via Akt hemmt.

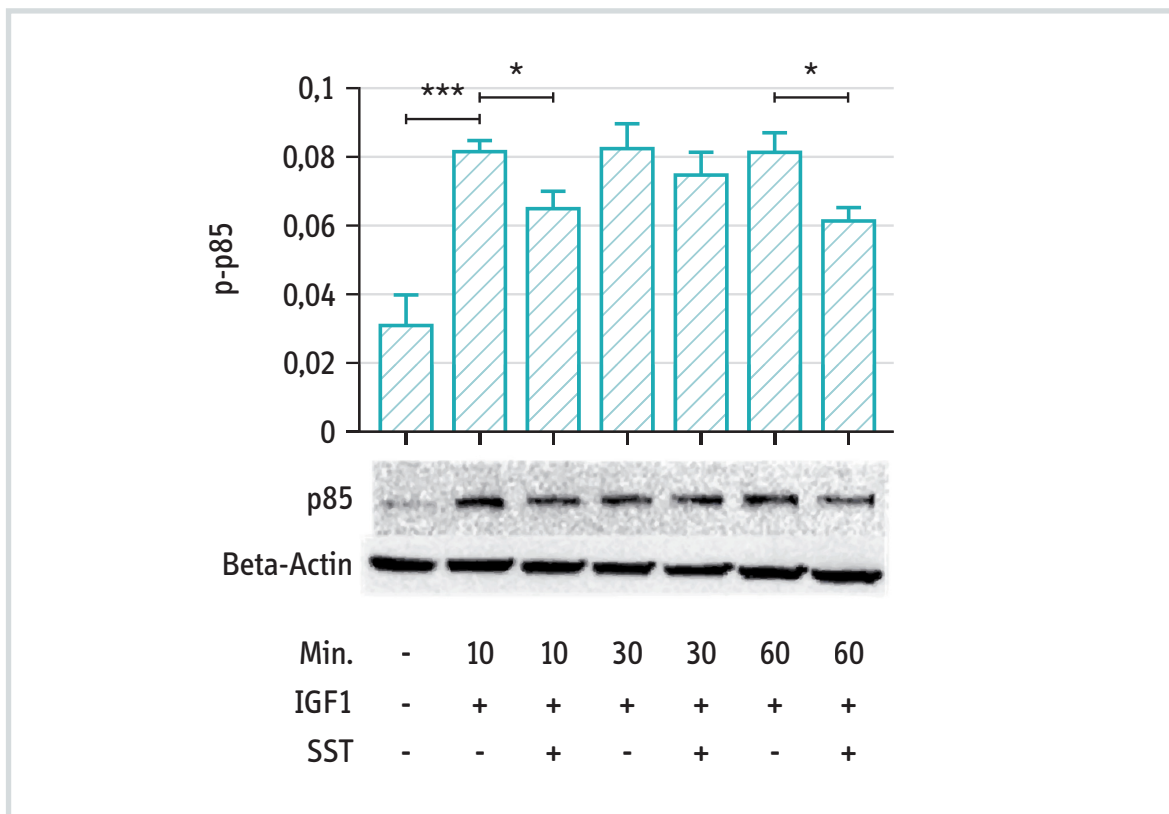


**Abbildung 11:** SST (100 nmol/l) und SSTR2-selektiver Agonist (100 nmol/l) vermindert die Phosphorylierung von Foxo-1 (p-Foxo-1) und steigert Foxo-1 Akkumulation im Zellkern von INS-1E Zellen. Es sind Banden in repräsentativen Western Blots gezeigt.



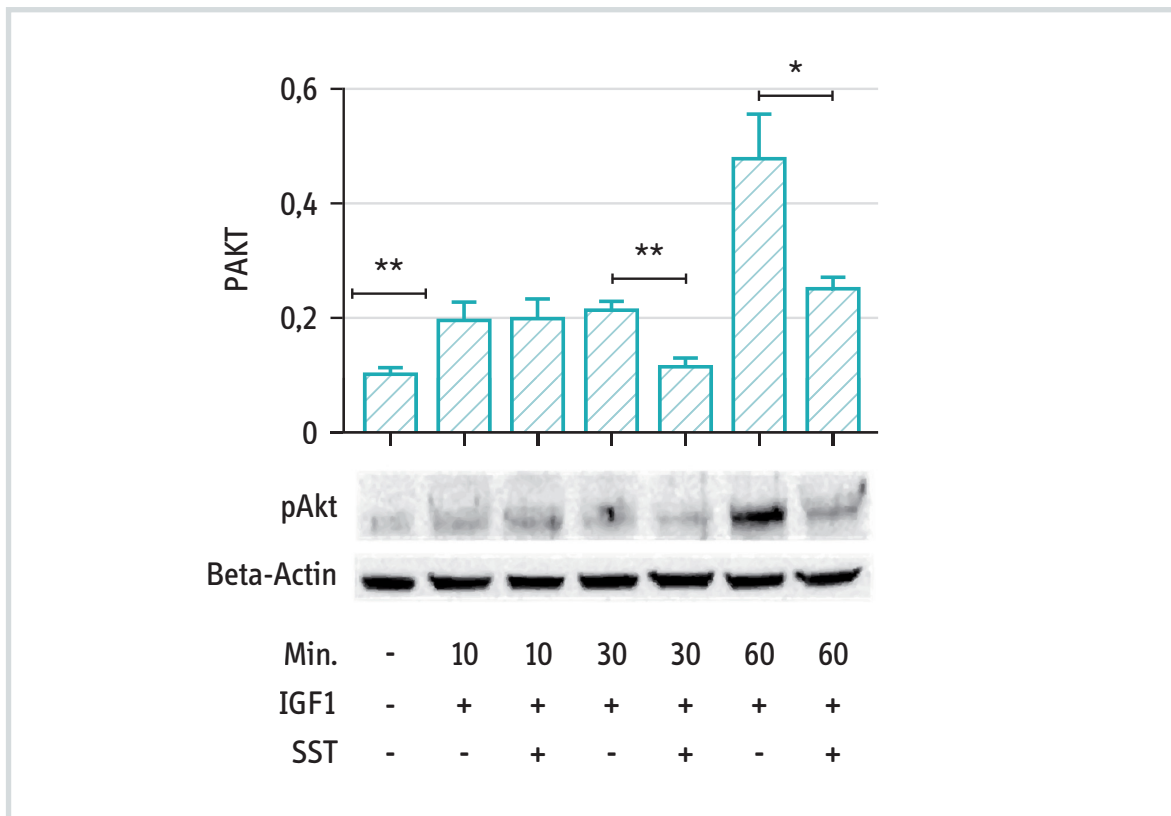
**Abbildung 12:** SST hemmt zeitabhängig die basale Phosphorylierung von Akt (pAkt).

Phosphatidylinositol 3-kinase und Akt vermitteln die trophischen Effekte von IGF-1 in den Zellen. Daher untersuchte ich, ob diese Kaskade auch in den INS-1E Zellen durch SST reguliert wird. Dazu analysierte ich die Phosphorylierung am Tyrosinrest der p85 Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase (Abb. 13) sowie der Akt Phosphorylierung (Abb. 14). IGF-1 (50 ng/ml) stimulierte zeitabhängig die Phosphorylierung am Tyrosinrest der p85 Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase und der Akt, während SST die Phosphorylierung beider Kinasen reduzierte. Die Hemmung von p85 war nach 10 und 60 Min. statistisch signifikant, während pAKT nach 30 und 60 Min durch SST gehemmt wurde. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass IGF-1 und SST einen gemeinsamen Weg einschlagen, der für die Modulation der Zellproliferation von Bedeutung ist.



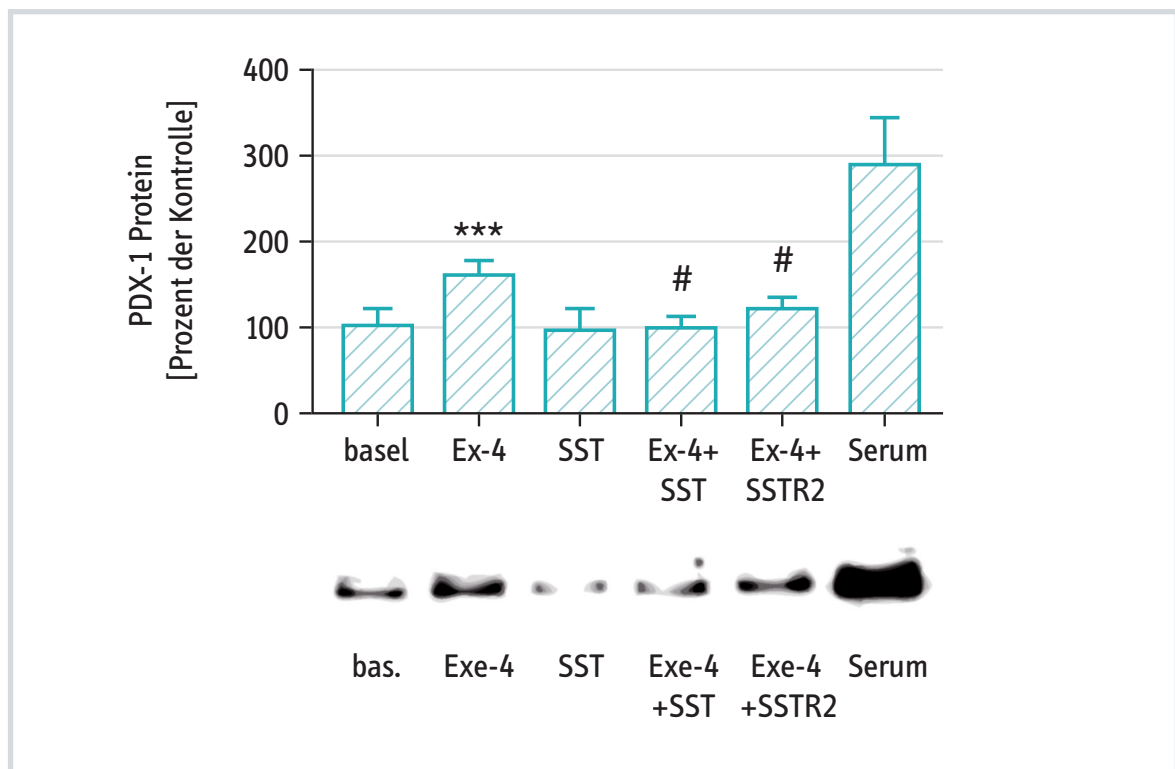
**Abbildung 13:** Zeitabhängige Hemmung der IGF-1-stimulierten Tyrosinrest-Phosphorylierung der p85 Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase durch SST, \* $p < 0,5$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Nur nach 10 und 60 Minuten waren die Unterschiede signifikant was die Hemmung von IGF-1 durch SST betrifft.





**Abbildung 14:** Zeitabhängige Hemmung der IGF-1-stimulierten Phosphorylierung von pAKT durch SST. IGF-1 wurde in einer Konzentration von 50 ng/ml eingesetzt, SST in einer Konzentration von 100 nmol/l. Messpunkte repräsentieren Mittelwerte +/- SEM ermittelt aus n = 3 – 4 unabhängigen Experimenten, \*p < 0,5, \*\*p < 0,01

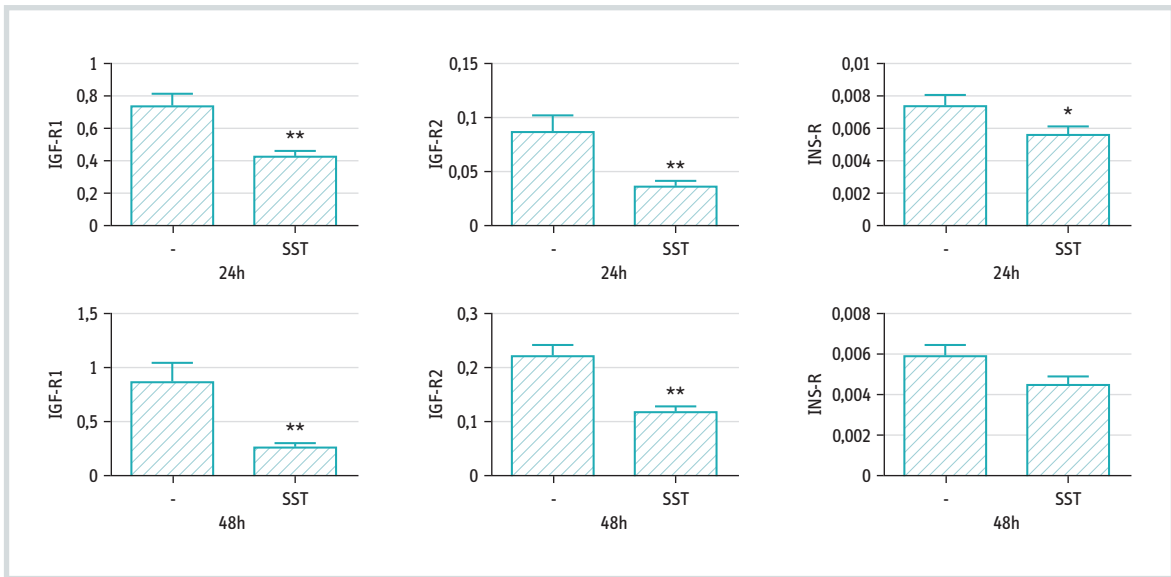
Der Beta-zellspezifische Transkriptionsfaktor PDX-1 besitzt eine Schlüsselbedeutung für die Regulation der Beta-Zellproliferation. PDX-1 wurde als Vermittler der GLP-1 stimulierten Beta-Zellproliferation bereits charakterisiert (Buteau J. et al. 1999; Shao S. et al. 2009). Es ist aus früheren Studien bekannt, dass Foxo-1 mit PDX-1 interagiert. Foxo-1 hemmt die Expression von PDX-1 und damit die Beta-Zellproliferation (Kitamura T. et al. 2002). Da SST die Foxo-1 Proteine im Nukleus stimuliert und die Beta-Zellproliferation hemmt, vermuteten wir, dass eine reduzierte PDX-1 Proteinproduktion in den Beta-Zellen vorzufinden ist. In der Tat zeigte sich, dass sowohl SST als auch ein SSSTR-2 selektive Agonist die Exendin-4 stimulierte PDX-1 Proteinproduktion im Nukleus hemmten (Abb. 15).



**Abbildung 15:** Stimulation der PDX-1-Proteinproduktion durch Exendin-4 und Hemmung der Exendin-4-stimulierten PDX-1 Proteinproduktion durch SST und einen SSTR2-Agonisten. \*\*\* $p < 0,001$  im Vgl. zur basalen Kontrolle; # $p < 0,05$  i. Vgl. zu Exendin-4-stimulierten PDX-1 Proteinproduktion. Bas: basale Expression; Exe-4: Exendin-4 (10 nmol/l); SST: Somatostatin (100 nmol/l), SSTR2: SSTR-2-selektiver Agonist (100 nmol/l).

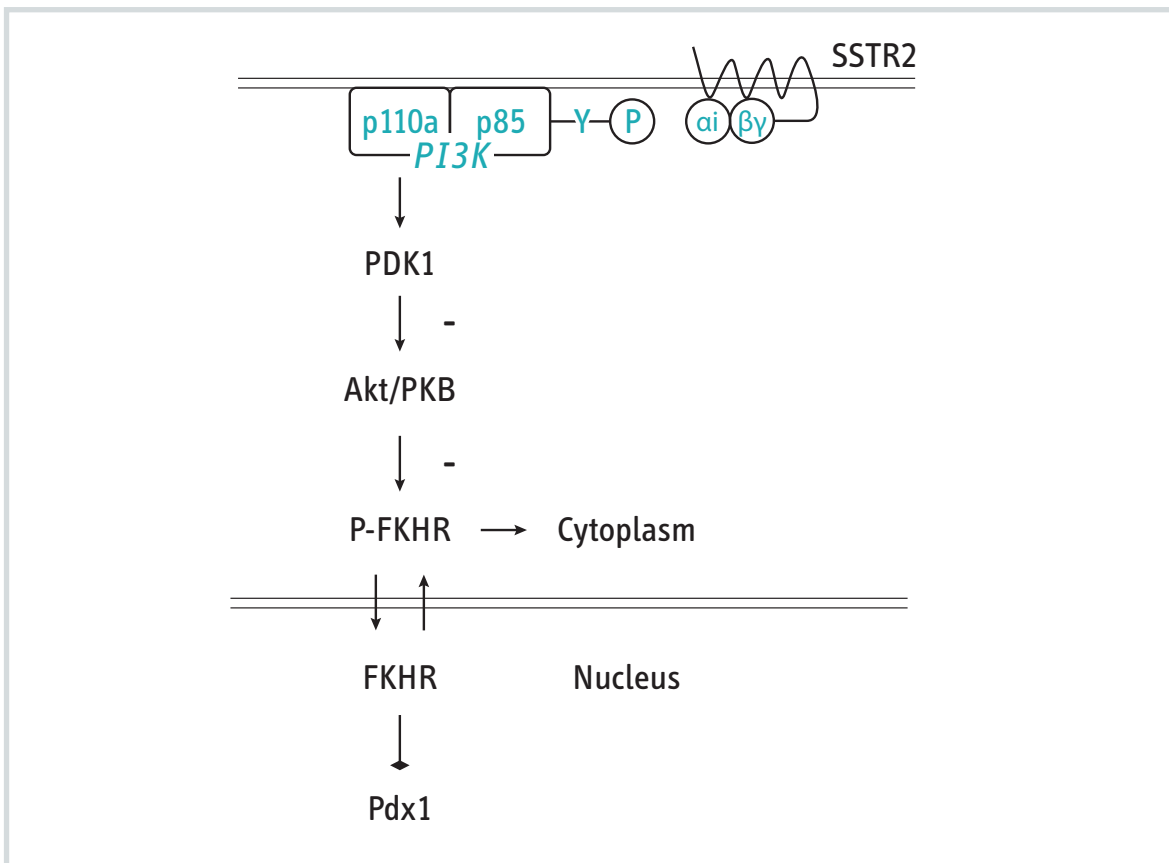
### 3.5 Effekte von SST auf die Expression von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren

Pankreatische Beta-Zellen exprimieren Rezeptoren für Wachstumsfaktoren. Da die Beta-Zellproliferation auch durch Wachstumsfaktoren beeinflusst wird, untersuchte ich die Effekte von SST auf die Rezeptorexpression für IGF-1, IGF-2 und Insulin. Es zeigte sich, dass SST die Rezeptorexpression für IGF-2 nach 24 und 48 Stunden hemmte (Abb. 16). Im Vergleich dazu wurde die IGF-1 Rezeptorexpression nur passager (nach 24 Stunden) durch SST herunterreguliert. Nach 48 Stunden war die Expression für IGF-1 Rezeptoren nach Inkubation mit SST vergleichbar mit der in den Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu wurde keine Veränderung der Expression für Insulinrezeptoren nach Inkubation mit SST über 24h oder 48h detektiert.



**Abbildung 16:** SST (100 nmol/l) hemmt die Expression von IGF-Rezeptor 1 (IGF-R1), IGF-Rezeptor 2 (IGF-R2) und Insulin-Rezeptor (Ins-R) in INS-1E Zellen nach 24- oder 48 Stunden. \* $p < 0,5$ , \*\* $p < 0,01$  vs. unbehandelte Kontrollzellen.

Insgesamt sprechen diese Daten dafür, dass SST die Proinsulin Transkription, Proinsulin-mRNS Expression, Beta-Zellproliferation über Akt, Foxo-1, PDX-1 sowie über die Änderungen der Rezeptorexpression für Wachstumsfaktoren beeinflussen kann. Die Insulinsekretion kann über die Änderung der aktiven Glut2 vermittelten Glukoseaufnahme moduliert werden.



**Abbildung 17:** Vereinfachte, modellhafte, graphische Darstellung der Wirkungen eines SSTR2-selektiven Agonisten auf die Aktivität/Phosphorylierung von PDX-1, Akt und Foxo-1 (Foxo-1 = FKHR = forkhead found in human rhabdomyosarcoma).

### 3.6 Effekte von SST auf die Funktion von Adipozyten

#### 3.6.1 Detektion der SSRTs in Präadipozyten und differenzierten Adipozyten

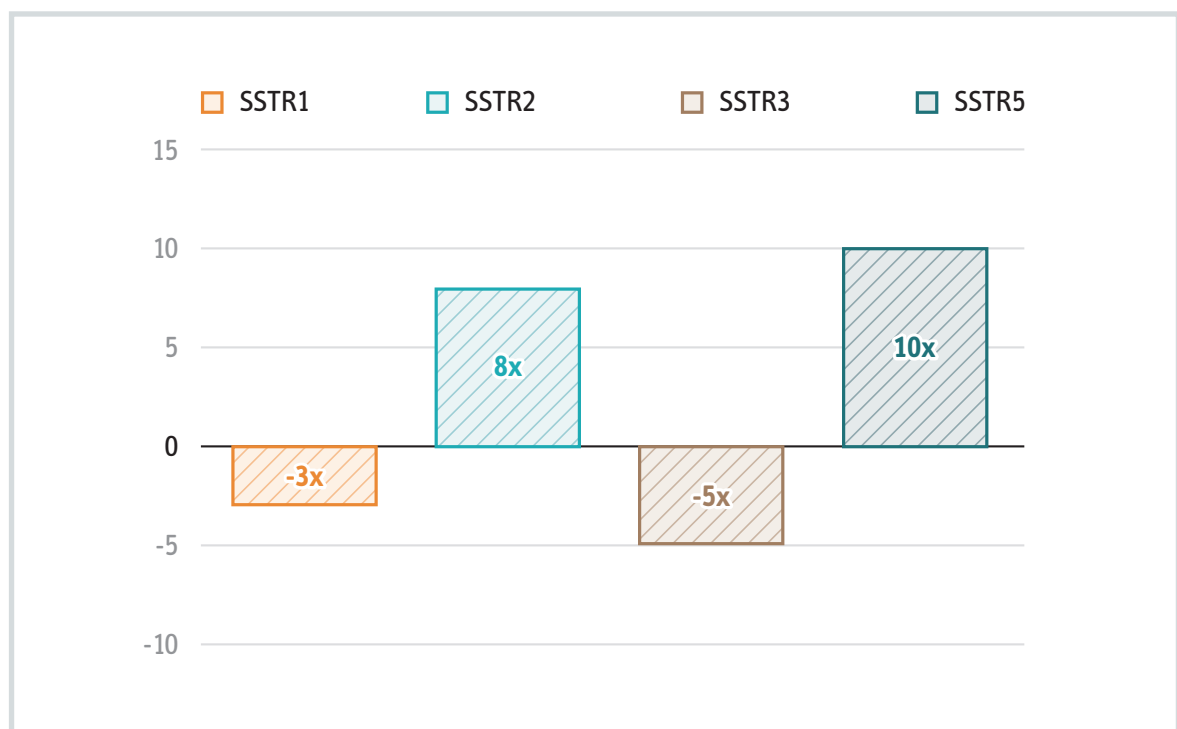
In 3T3-L1 Präadipozyten konnte mittels quantitativer RT-PCR mRNS für folgende Rezeptoren nachgewiesen werden: SSTR1, SSTR2, SSTR3 und SSTR5. Im Gegensatz dazu konnte SSTR4 Expression in diesen Zellen nicht nachgewiesen werden.

Im Zuge der standardisierten Differenzierung von Präadipozyten (Fibroblasten) zu reifen Adipozyten zeigten sich Änderungen der SSTR-Expression (Abb. 18). Insgesamt konnte eine gesteigerte Expression für SSTR2 (8-fach) und SSTR5 (10-fach), während die Expression von SSTR1 (-3-fach) und SSTR3 (-5-fach) sank (Abb. 19).

Diese Daten sprechen dafür, dass SSTRs eine Rolle für die Regulation von Adipozyten haben könnte. Möglicherweise spielen die SSTRs eine Rolle für die Differenzierung der Adipozyten.

	undifferenzierte Fibroblasten	undifferenzierte Adipozyten	isolierte Adipozyten der Ratte
SSTR1	35,055	0,097	nd
SSTR2	0,003	0,021	1681,32
SSTR3	2,313	4,724	5,216
SSTR4	null	null	nd
SSTR5	5.946,039	585.178	0,235

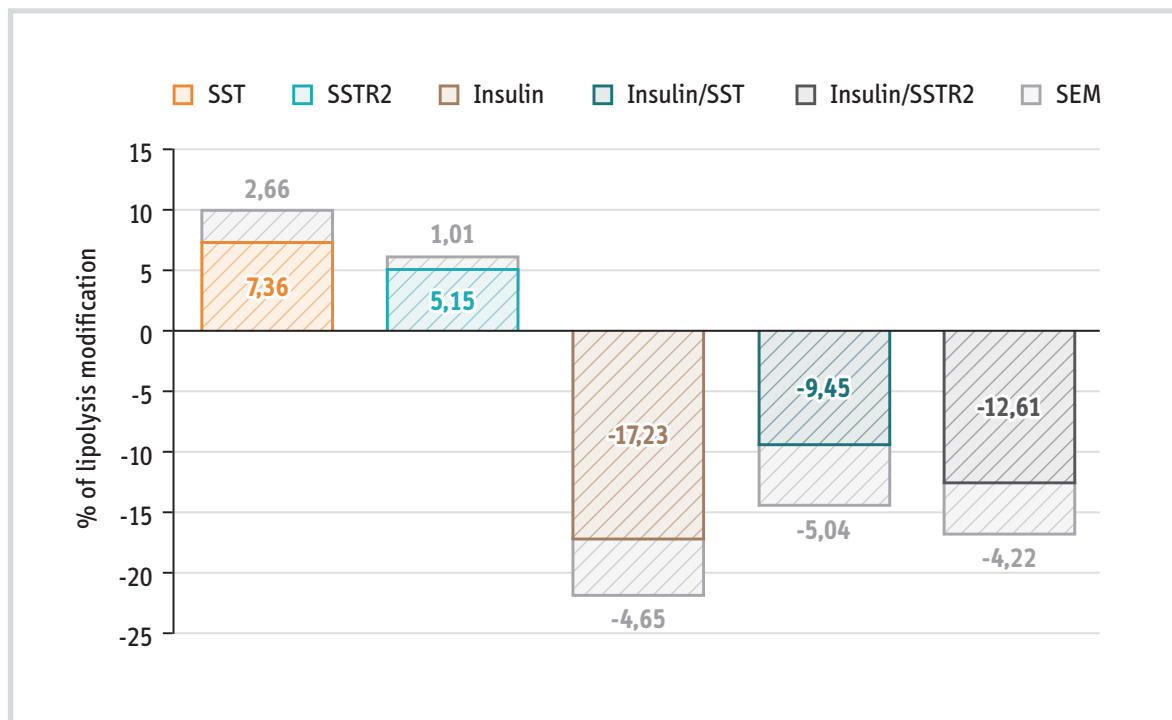
**Abbildung 18:** Expression von SSTR1 – SSTR5 in differenzierten und in undifferenzierten 3T3-L1 Zellen sowie in Adipozyten der Ratte (Null = nicht detektierbar, nd = nicht getestet).



**Abbildung 19:** Relative Veränderung der SSTR-Expressionen in differenzierten 3T3-L1 Adipozyten. Daten zeigen x-fache Steigerung oder Reduktion der Expression im Vergleich zu undifferenzierten Zellen. Einschränkung: Es sind Daten aus nur einem Experiment erfasst. Daher konnte eine statistische Analyse nicht durchgeführt werden.

### 3.6.2 Effekte von SST auf die Lipolyse in Adipozyten

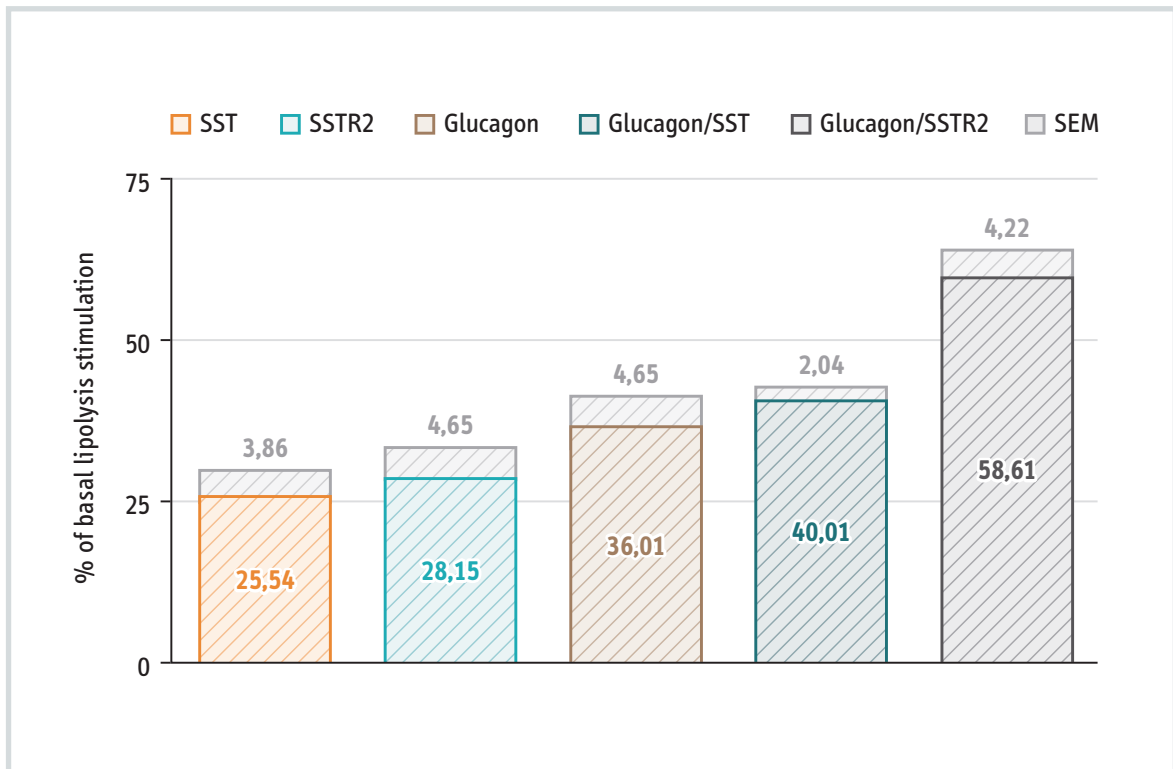
Die Effekte der Lipolyse wurden in differenzierten 3T3-L1 Adipozyten sowie in isolierten primären Rattenadipozyten charakterisiert. SST und SSTR2-selektiver Agonist stimulierten die basale Lipolyse in 3T3-L1 Adipozyten um 7,36 und 5,15 Prozent im Vergleich zu Adipozyten, inkubiert ohne SST oder Agonisten. Im weiteren Verlauf wurden die Effekte von SST und SSTR2-Agonisten auf die Lipolyse in Adipozyten untersucht, die zusätzlich mit Insulin inkubiert wurden. Erwartungsgemäß hemmte Insulin die Lipolyse in 3T3-L1 Adipozyten (Hemmung um 17,23 Prozent gegenüber den unbehandelten Kontrollen) (Abb. 20). SST und ein SSTR2-selektiver Agonisten hoben partiell die antilipolytische Aktivität von Insulin in 3T3-L1 Adipozyten auf (Abb. 20).



**Abbildung 20:** SST und SSTR2-selektiver Agonist stimulieren die Lipolyse und mindern die antilipolytische Aktivität von Insulin. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM (grau) aus 3–5 unabhängigen Experimenten.

Im Weiteren untersuchte ich die Effekte von SST und eines SSTR2-Agonisten auf die Lipolyse in isolierten primären Rattenadipozyten. Die Adipozyten wurden aus dem Abdomen und epididymalen Fettgewebe der Ratten entnommen und entsprechen dem viszeralen Fettgewebsdepot. Glukagon (100 nM) stimulierte die Lipolyse in isolierten Rattenadipozyten im Vergleich zu basaler Lipolyse um 36,01 Prozent. In Anwesenheit

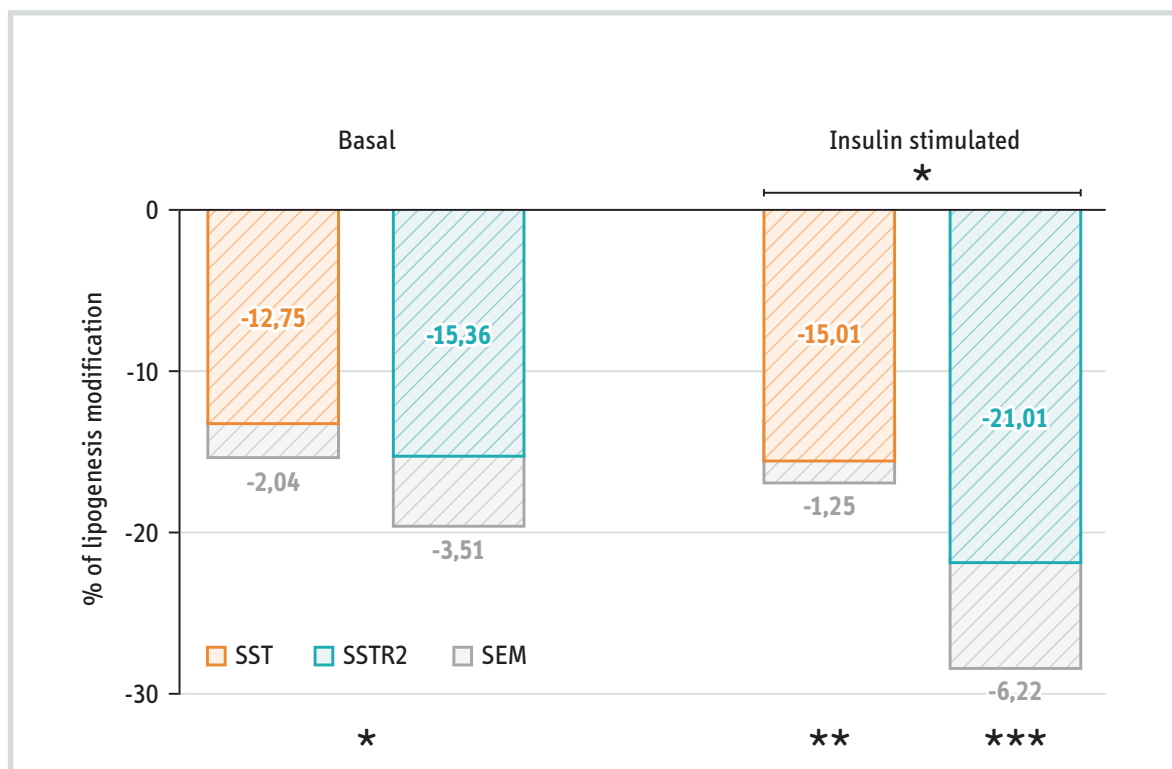
von SST oder des SSTR2-selektiven Agonisten wurde die lipolytische Eigenschaft von Glukagon um 40,01 Prozent (SST) und um 58,61 Prozent (SSTR2 Agonist) potenziert (Abb. 21).



**Abbildung 21:** SST und SSTR2-Agonist potenzieren die Glukagon-stimulierte Lipolyse. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM (grau) aus 3–5 unabhängigen Experimenten.

### 3.6.3 Effekte von SST auf die Lipogenese

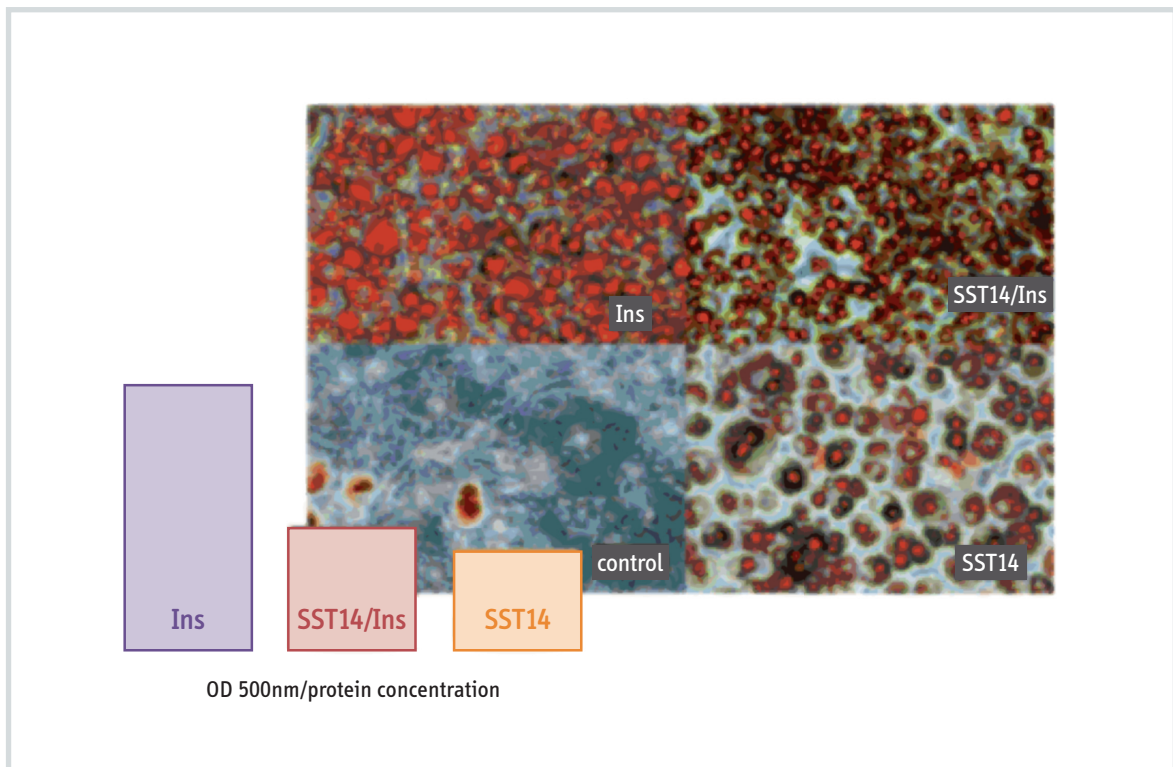
Die Effekte von SST auf die Lipogenese wurden in primären Rattenadipozyten untersucht. Sowohl SST als auch SSTR2-Agonist hemmten die basale Lipogenese um 12,75 Prozent und 15,36 Prozent (Abb. 22). Das anabol wirksame Insulin stimulierte die Lipogenese im Vergleich zur basalen Rate um 23 Prozent (Daten nicht gezeigt). SST und SSTR2-Agonist hemmten die Insulin-stimulierte Lipogenese um 15,01 Prozent und um 21,01 Prozent (Abb. 22).



**Abbildung 22:** SST und SSTR2-Agonist inhibieren die basale sowie die Insulin-stimulierte Lipogenese. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM (grau) aus 3 – 5 unabhängigen Experimenten.

Außerdem konnte mittels Oil red O Detektion der Triglyceridgehalt in differenzierten 3T3-L1 Zellen visualisiert werden. Dabei zeigte sich, dass der Lipidgehalt in den 3T3-L1 Zellen durch Behandlung mit SST (100 nmol/l) über einem Zeitraum von 14 Tagen sank (Abb. 23).





**Abbildung 23:** Oil red O zur Bestimmung und Visualisierung des Triglyceridgehaltes in 3T3-L1 Zellen nach Behandlung mit Insulin (Ins) und SST (SST14) in einem Zeitraum von 14 Tagen.

Insgesamt sprechen diese Daten dafür, dass SST und sowie SSTR2-Agonist die Lipolyse in den 3T3-L1 Zellen regulieren können. SST und SSTR2-Agonist stimulieren die basale und potenzieren die Glukagon-stimulierte Lipolyse in Adipozyten und schwächen die antilipolytische Eigenschaft von Insulin ab. Darüber hinaus hemmt SST sowie ein SSTR2-Agonist die basale sowie die Insulin-stimulierte Lipogenese in Adipozyten.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit untersuchte ich im ersten Abschnitt die Regulation der Proinsulin-Expression und Beta-Zellproliferation durch SST und wies darüber hinaus nach, dass die Regulation durch den SSTR2 vermittelt wird. In diesem Kontext beschrieb ich auch die Effekte von SST und eines SSTR-2-selektiven Agonisten auf die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade, die für die Regulation der Proinsulin-Genexpression und Beta-Zellproliferation von Bedeutung ist. Dabei zeigte ich, dass SST die Insulinsekretion, -neosynthese und Beta-Zellproliferation hemmt. Diese inhibitorische Wirkung auf die pankreatischen Beta-Zellen steht im Einklang mit dem sogenannten „Dekretin“-Konzept von SST (Ensinck J. W. et al. 1997). Darunter ist zu verstehen, dass SST, welches nach Einnahme von Nahrung vermehrt aus den pankreatischen D-Zellen freigesetzt wird, die ebenfalls Nahrung-stimulierte Insulinsekretion hemmt. Es ist bekannt, dass SST nach Nahrungsaufnahme, ebenso wie Insulin freigesetzt wird (Unger R. H. et al. 1978). Die Freisetzung von SST wird u. a. durch Kohlenhydrate (Glukose) gesteigert (Unger R.H. et al. 1978). SST wirkt inhibitorisch auf die prandiale Sekretion von Insulin (Unger R. H. et al. 1978). Im Gegensatz dazu werden Hormone, wie z. B. GLP-1, die die Insulinsekretion nach Nahrungsaufnahme steigern, als Inkretine bezeichnet (Fehmann H. C. et al. 1995). SST beugt einer vermehrten Sekretion von Insulin nach Einnahme von Mahlzeiten vor. Eine unverhältnismäßig gesteigerte prandiale Insulinsekretion würde zu einer Hypoglykämie führen. Die Insulinkonzentration fällt nach Nahrungsaufnahme jedoch sehr schnell auf die präprandialen Werte ab. Dabei scheint SST eine wichtige Rolle zu spielen.

Die Effekte von SST auf die Insulinproduktion sowie die Beta-Zellproliferation können für die physiologische Konstanthaltung der Beta-Zellmasse von Wichtigkeit sein. Es ist bekannt, dass Glukose die Beta-Zellproliferation stimuliert (Henquin J. C. 2000). Auch Insulin selbst führt bei hohen Glukosekonzentrationen zu einer Hyperproliferation der pankreatischen Beta-Zellen (Ballian N. et al. 2007). Mäuse, die eine Inaktivierung der SSTRs aufweisen, zeigen vergrößerte Beta-Zellen und eine erhöhte Expression von Proliferationsmarkern der pankreatischen Beta-Zellen (Zhou G. et al. 2012). Da es beim Diabetes mellitus Typ 2 zu einem relativen Überschuss der D-Zellmasse im Pankreas und außerdem zu einem Untergang von pankreatischen Beta-Zellen kommt, sind die Erkenntnisse aus meiner Dissertation möglicherweise von pathophysiologischer Bedeutung. Einschränkend muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass der Beweis für meine Hypothese bisher nicht erbracht wurde.

Sowohl beim Diabetes mellitus Typ 1 als auch beim Typ 2 (Stadium-abhängig) beobachtet man einen relativen oder absoluten Mangel an Insulin-produzierenden Beta-Zellen (Kahn C. R. 1994). Es sind mehrere Theorien vorhanden, die diese Alteration des endokrinen Pankreas beim Diabetes mellitus Typ 2 erklären. Eine davon ist die Glukolipotoxizitäts-Theorie. Diese experimentell validierte Theorie besagt, dass sowohl Hyperglykämie als auch die Hypertriglyceridämie zu einer Apoptose von Beta-Zellen beitragen (Robertson R. P. et al. 2004; Roger H. et al. 2008). Auch der bereits erwähnte Überschuss an SST kann einen negativen Einfluss auf die Beta-Zelltrophik haben.

Im Einklang damit stehen meine aktuellen Daten, die zeigen, dass SST einen hemmenden Effekt auf die Beta-Zellproliferation haben kann. Solche proliferationshemmenden Effekte von SST sind bereits aus Studien an humanen neuroendokrinen Tumoren bekannt (Keskin O. et al. 2013; Wang L. et al. 2013). Auch tierexperimentelle Daten sowie in vitro Untersuchungen belegen die hemmende Eigenschaft von SST auf die Proliferation von Beta-Zellen (Zhou G. et al. 2012; Ballian N. et al. 2007). Dabei werden sowohl antiangiogene Eigenschaften von SST diskutiert, als auch die Hemmung der Freisetzung von trophischen Faktoren, wie z. B. des Wachstumshormons (Keskin O. et al. 2013). In meiner Studien konnte ich nachweisen, dass SST die Aktivierung von Akt und p85 hemmt. Beide Kinasen sind für Regulation des Wachstums von Beta-Zellen von besonderer Wichtigkeit. Darüber hinaus zeigte ich, dass auch die nukleäre Expression des pancreatic und duodenal homeobox factor-1 (PDX-1) durch SST gehemmt wird. Weiterhin führte SST zu einer nukleären Expulsion des Transkriptionsfaktors Foxo-1. Beide Transkriptionsfaktoren (PDX-1 und Foxo-1) sind sowohl für die Proliferation und Differenzierung von pankreatischen Beta-Zellen von immenser Bedeutung, als auch für die Regulation der Insulin-Gentranskription. Akt stimuliert PDX-1 und führt zu einer Expulsion von Foxo-1. Daher scheint SST die Aktivität/Expression von PDX-1 und Foxo-1 über die Regulation von Akt zu beeinflussen. Schließlich beobachtete ich, dass SST die Expression von Hormonrezeptoren für IGF-1 und vor allem IGF-2 auf pankreatischen Beta-Zellen hemmt. Es ist bekannt, dass beide Rezeptoren für das Wachstum von Beta-Zellen eine wichtige Rolle spielen. Das Fehlen oder ein Defekt der Rezeptoren führt zu einem Verlust der Beta-Zell-Masse. Auf der anderen Seite wurde gezeigt, dass Inkretine (z. B. GLP-1) die Beta-Zell-Masse steigern können. Dies geschieht indem die Affinität von Rezeptoren für IGF-1/IGF-2 gesteigert wird und die Apoptose der Beta-Zellen als Folge vermindert wird. Letztendlich konnte ich in meinen Experimenten nachweisen, dass SST die Proliferation der Beta-Zellen hemmt. Dabei scheint SST nicht nur direkt in die Regulation der Transkriptionsmaschinerie der Beta-Zellen einzugreifen, sondern auch die Expression von trophischen Hormonrezeptoren zu inhibieren. Zusammengefasst ist

SST ein Hemmer der Insulinsekretion, -neosynthese und Beta-Zellproliferation. Diese Wirkungen werden über unterschiedliche Mechanismen entfaltet. Im Gegensatz zu den Inkretinen, scheint also SST den Begriff Dekretin gerechtfertigt zu tragen.

Im zweiten Abschnitt meiner Dissertation konnte ich die Expression von SSTRs in murinen Adipozyten nachweisen. Darüber hinaus konnte ich die Änderungen der SSTR-Expression nach erfolgter experimenteller Differenzierung von Präadipozyten zu adulten reifen Adipozyten identifizieren. An isolierten primären Adipozyten der Ratte konnte ich die lipolytische Eigenschaften von SST alleine oder in Kombination mit Glukagon nachweisen. Die Hemmung der basalen oder Insulin-stimulierten Lipogenese durch SST, war mit einem geringeren Triglyceridgehalt der Adipozyten assoziiert. Damit konnte ich SST insgesamt als antilipolytisches Hormon (zumindest *in vitro*) nachweisen. Im Gesamtkontext bedeutet dies, dass SST inhibitorische Effekte auf die pankreatische Beta-Zellfunktion (Proliferation und Insulinsekretion) hat. SST scheint als ein kataboles Hormon zu wirken.

In meiner Dissertation konnte ich neben den bekannten inhibitorischen Eigenschaften von SST auf die Insulinfreisetzung, auch eine Hemmung der Proinsulin-mRNS Expression nachweisen. Bekanntlich sind pankreatische Beta-Zellen in der Lage, präformierte sekretorische Insulin-haltige Granula rapide unmittelbar nach Kontakt mit dem Stimulus (z. B. Glukose) freizusetzen. Aus langer Sicht ist es jedoch notwendig, Substrate für die Insulinneusynthese zu liefern. Insgesamt betrachtet, hemmt SST nicht nur die akute Insulinfreisetzung, sondern auch die Insulinneosynthese. Ein weiterer Mechanismus der Regulation der Insulinsekretion erfolgt Glut2-abhängig. Dieses Transportprotein sorgt für die Glukoseaufnahme in die Zelle. Mit der Phosphorylierung der Glukose durch Glukokinasen wird die Glykolyse eingeleitet. Dies hat zur Folge, dass vermehrt ATP gebildet wird, was zu einer Depolarisation der Beta-Zellen, zu einem Calciumeinstrom und Entleerung der Insulinspeicher führt (Henquin J. C. 2000). Eine Reduktion der Glut2 Transporter wird nicht nur in Tiermodellen des Diabetes mellitus Typ 2 vorgefunden, sondern ist ein Merkmal des sog. MODY Typ 2 (Strowski M. Z. et al. 2004). Diese Form des Diabetes ist dadurch gekennzeichnet, dass Glukose nicht zu einem adäquaten Anstieg der Insulinsekretion führt. Infolge dessen kommt es zum manifesten Diabetes mellitus bereits in jungen Jahren (Strowski M. Z. et al. 2004). SST scheint die Glukoseaufnahme in die Beta-Zellen zu hemmen. Darüber hinaus auch die Translokation von Glut2 in die Plasmamembran. Folge dieser inhibitorischen Wirkung von SST auf die Glukoseaufnahme, ist die Reduktion des sog. „glucose sensing“. Dadurch wird weniger Insulin freigesetzt. In Tiermodellen ist beschrieben, dass beim Diabetes mellitus Typ 2 ein relativer Überschuss von SST-produzierenden Zellen vorkommt (Iki K. & Pour P. M. 2007). Möglicherweise

führt der Überschuss von SST über die von mir hier erstmalig beschriebene Hemmung der Glukoseutilisation und Glut2 Membrantranslokation zu einer Reduktion der Insulinfreisetzung.

Dies impliziert, dass SST die anabolen Wirkungen von Insulin, durch Hemmung der Insulinfreisetzung aus pankreatischen Beta-Zellen, aufheben kann. Eine der Wirkungen von Insulin ist die Stimulation der Lipidakkumulation in den Fettzellen (Quesada I. et al. 2008). Untersuchungen von Lustig R. H. et al. ergaben, dass Patienten, die mit Octreotid, einem SST-Agonisten, behandelt wurden, eine Reduktion des Übergewichts zeigten (Lustig R. H. et al. 2002). Als wesentliche Wirkung des Octreotids wurde die Suppression der Insulinfreisetzung postuliert, mit der Konsequenz, dass weniger Fett in den Adipozyten gespeichert wurde. Die hormonelle Wechselwirkung zwischen dem endokrinen Pankreas und dem Fettgewebe funktioniert allerdings auch umgekehrt. Das Fettgewebe setzt nicht nur Fettsäuren und Glycerol frei, sondern ist auch eine Quelle für eine Vielzahl von Hormonen, den sog. Adipokinen (Trayhurn P. et al. 2001; Rajala M. W. et al. 2003). Diese, wie z. B. Leptin, haben eine direkt hemmende Wirkung auf die Freisetzung von Insulin aus dem endokrinen Pankreas (Trayhurn P. et al. 2001; Emilsson V. et al. 1997; Seufert J. 2004). Andere Adipokine wie etwa Adiponektin stimulieren die Insulinsekretion (Rajala M. W. et al. 2003; Waki H. et al. 2007) und verbessern außerdem die Glykämie beim Diabetes mellitus Typ 2. Die Fehlfunktion der sog. adipoinsulinäre Achse hat eine wichtige Bedeutung in der Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 2. In dieses System scheint SST einzugreifen. Diese Erkenntnis basiert auf den Ergebnissen aus früheren Untersuchungen (Zhou G. et al. 2012). Sie sind Grundlage für die Untersuchungen der Effekte von SST auf die Funktionen von pankreatischen Beta-Zellen und Adipozyten. SST greift in die adipoinsulinäre Achse ein. Dabei scheint SST nicht nur die Insulinfreisetzung aus den pankreatischen Beta-Zellen zu inhibieren. Es hemmt außerdem die Lipidakkumulation in den Fettzellen direkt über die Inhibition der Lipogenese. Weiterhin stimuliert SST die Lipolyse.

Als weitere neue Erkenntnis habe ich gezeigt, dass SSTRs sowohl auf Präadipozyten als auch auf Fibroblasten exprimiert werden. Die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten führte zu einer veränderten Regulation der SSTR-Expression. Solche Alteration für SSTR1 und SSTR2 wurde bereits in der Vergangenheit gezeigt. Allerdings wurde die Differenzierung von SSTR3 und SSTR5 bisher noch nicht untersucht. Aus meinen Untersuchungen ergab sich, dass die Expression von SSTR2 und SSTR5 anstieg, während die Expression von SSTR1 und SSTR3 abnahm.

Es stellt sich die Frage nach den funktionellen Konsequenzen der Alterationen der SSTR-Expression in den Adipozyten. In den weiterführenden Untersuchungen konnte ich beobachten, dass SST und ein SSTR2-selektiver Agonist die Lipolyse stimulieren. Auch die Glukagon-stimulierende Lipolyse wurde nach Ko-Inkubation mit einem SSTR2-Agonisten und SST potenziert. Glukagon ist ein wichtiger Gegenspieler von Insulin. Glukagon wirkt lipolytisch und es sind bereits Überlegungen geführt wurden, Glukagon für die Reduktion des Gewichts bei Patienten mit Adipositas einzusetzen. Allerdings sind andere Aspekte der Wirkung von Glukagon zu berücksichtigen, so dass bisher die Versuche auf präklinischer Ebene beschränkt sind. SST und SSTR2-Agonist konnten die Lipogenese hemmen. Auch die Insulin-stimulierende Lipogenese wurde gehemmt. Erwartungsgemäß führte die Behandlung von Adipozyten mit SST und SSTR2-Agonist zu einer Reduktion des Lipidgehalts. Damit scheint SST aus therapeutischer Sicht zur Senkung des Gewichts geeignet zu sein. Meine Beobachtungen in vitro decken sich mit den in vivo Resultaten der Studien von Lustig R. H. et al. 2002. Er und seine Mitarbeiter zeigten, dass Octreotide zu einer Senkung des Gewichtes führen. Ich konnte nachweisen, dass die katabole Eigenschaft von SST nicht nur über die Hemmung der Insulinsekretion zustanden kommt, sondern dass SST direkt die Lipolyse in den Fettzellen stimuliert.

Zusammengefasst kann SST als „Dekretin“ bezeichnet werden. Es hemmt die Insulinfreisetzung, Insulinneusynthese, Beta-Zellproliferation über unterschiedliche Mechanismen. Darüber hinaus scheint SST katabol zu sein, indem es auch die Lipidakkumulation in Fettzellen hemmt. Dabei ist die Stimulation der Lipolyse und Hemmung der Lipogenese von Bedeutung. Aus klinischer Sicht wäre SST möglicherweise im Kontext der Regulation von Adipositas interessant. Allerdings muss die Eigenschaft von SST in vivo zunächst in präklinischen Studien untersucht werden. Ob die Hemmung von Insulin und der Fettakkumulation einer Rolle bei Adipositas spielt ist denkbar. Allerdings fehlen bisher die Untersuchungen, die den Zusammenhang erhärten würden.

### III Literaturverzeichnis

#### A

---

Andralojc KM, Mercalli A, Nowak KW, Albarello L, Calcagno R, Luzi L, Bonifacio E, Doglioni C & Piemonti L, Ghrelin-producing epsilon cells in the developing and adult human pancreas. *Diabetologia*, 2008, Vol.52, 486–493

#### B

---

Ballian N, Hu M, Liu SH & Brunnicardi C, Proliferation, Hyperplasia, Neogenesis, and Neoplasia in the Islets of Langerhans. *Pancreas* 2007, Vol.35, No.3, 199-206

Ballian N, Brunnicardi C & Wang XP, Somatostatin and its Receptors in the Development of the Endocrine Pancreas. *Pancreas*, 2008, Vol.33, No.1, 1-12

Barnett P, Somatostatin and Somatostatin Receptor Physiology. *Endocrine*, 2003, Vol.20, No.3, 255-264.

Berry DC, Stenesen D, Zvev D & Graff JM, The developmental origins of adipose tissue. *Development* 140, 2013, 3939-3949

Boehm BO & Lustig RH, Use of Somatostatin receptors ligands in obesity and diabetic complications. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2002, Vol.16, No.3, 493-509

Bonner-Weir, S,  $\beta$ -Cell Turnover-Its Assessment and Implications. *Diabetes* 50,2001, Suppl. 1, 20-24.

Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J & Guillemin R, Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, 1973, Vol.179,77-79

Brunnicardi, FC, Kleinman R, Moldovan S, Thu-Ha Liz Nguyen, Watt PC, Walsh J & Gingerich R, Immunoneutralization of Somatostatin, Insulin, and

Glucagon Causes Alterations in Islet Cell Secretion in the Isolated Perfused Human Pancreas. *Pancreas*, 2001, Vol. 23, No. 3, pp. 302–308

Brunnicardi FC, Atiya A, Moldovan S, Lee TC, Fagan SP, Kleinman RM, Adrian TE, Coy DH, Walsh JH & Fisher WE, Activation of Somatostatin Receptor Subtype 2 Inhibits Insulin Secretion in the Isolated Perfused Human Pancreas. *Pancreas*, 2003, Vol.27, e84–e89

Buteau J, Roduit R, Susini S & Prentki M, Glucagon-like peptide-1 promotes DNA synthesis, activates phosphatidylinositol 3-kinase and increases transcription factor pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1) DNA binding activity in beta (INS-1)-cells. *Diabetologia*, 1999, Vol.42, 856-864

Buteau J, Spatz ML & Accili D, Transcription Factor FoxO1 Mediates Glucagon-Like Peptide-1 Effects on Pancreatic  $\beta$ -Cell Mass. *Diabetes* 2006, Vol.55, 1190-1196

#### C

---

Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren P-O & Caicedo A, The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *PNAS*, 2006, Vol.103, No7, 2334-2339

Carlson MG, Snead WL & Campbell PJ, Regulation of Free Fatty Acid Metabolism by Glucagon. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1993, Vol.77, No.13,11-15

Collombat P, Xu X, Ravassard P, Sosa-Pineda B, Dussaud S, Billestrup N, Madsen OD, Serup P, Heimberg H & Mansouri A, The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into  $\alpha$ - and subsequently  $\beta$ -cells. *Cell*. 138(3), 2009, 449–462.

**E**

Ensinnck JW, Vogel RE, Laschansky EC, Koerker DJ, Prigeon RL, Kahn SE & D'Alessio DA, Endogenous Somatostatin-28 Modulates Postprandial Insulin Secretion. *J. Clin. Invest.*, 1999, Vol.100, No. 9, 2295–2302

**F**

Fehmann HC, Goke R & Goke B, Cell and Molecular Biology of the Incretin Hormones Glucagon-Like Peptide-I and Glucose-Dependent Insulin Releasing Polypeptide. *Endocrine Reviews*, 1995, Vol.16, No.3, 390-410

Fehmann HC, Strowski MZ & Göke B, Diabetes mellitus mit monogen determinierter Störung der Beta-Zell-Funktion. *Deutsches Ärzteblatt*, 2004, Jg. 101, Heft 13, A860-A867

Fontés G, Zarrouki B, Hagman DK, Latour MG, Semache M, Roskens V, Moore PC & Prentki M, Glucolipototoxicity age-dependently impairs beta cell function in rats despite a marked increase in beta cell mass. *Diabetologia*, 2010, 53(11), 2369–2379

**G**

Gross DN, APJ van den Heuvel & Birnbaum MJ, The role of FoxO in the regulation of metabolism. *Oncogene*, 2008, Vol.27, 2320–2336

**H**

Henquin JC, Triggering and Amplifying Pathways of Regulation of Insulin Secretion by Glucose. *Diabetes*, 2000, Vol.49, 1751–1760,

**I**

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), 111-118

**K**

Kaczmarek P, Singh V, Cashen DE, Yang L, Berk S, Pasternak A, Yiong Y, Shen D-M, Hutchins SM, Chapman K, Wiedenmann B & Schaeffer JM, Somatostatin receptor subtype 2 and 5 mediate inhibition of egg yolk-induced gall bladder emptying in myce. *Neurogastroenterol Motil*, 2010 Vol.22, No. 2, 204-e66

Kahn CR, Insulin Action, Diabetogenes, and the Cause of Type II Diabetes. *Diabetes*, 1994, Vol.43, 1066-1084

Keskin O, Yalcin S, A review of the use of somatostatin analogs in oncology. *OncoTargets and Therapy*, 2013, Vol.6, 471–483

Kitamura T, Nakae J, Kitamura Y, Kido Y, Biggs WH III, Wright CVE, White MF, Arden KC & Accili D, The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signaling to Pdx1 regulation of pancreatic  $\beta$  cell growth. *J. Clin. Invest.*, 2002, Vol.110, 1839–1847

Krulich, L, Dhariwal, APS & McCann SM, Stimulatory and Inhibitory Effects of Purified Hypothalamic Extracts on Growth Hormone Release from Rat Pituitary in Vitro. *Endocrinology*, 1968, 83, 783–790.

Kumar U, Sasi R, Suresh S, Patel A, Thangaraju M, Metrakos P, Patel SC, Patel YC, Subtype-Selective Expression of the Five Somatostatin Receptors (hSSTR1-5) in Human Pancreatic Islet Cells. *Diabetes* 1999, Vol.48, 77-85

Kumar U, Grant M, Somatostatin and Somatostatin Receptors. *Cellular Peptide Hormone Synthesis and Secretory Pathways. Results Probl Cell Differ.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, 137-184

**L**

Lamberts SWJ, Krenning EP & Reubi JC, The Role of Somatostatin and Its Analogs in the Diagnosis and Treatment of Tumors. *Endocrine Reviews*, 1999, Vol.12, No.4, 450-482



Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, MCGarry JD & Unger RH,  $\beta$ -Cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: Impairment in adipocyte- $\beta$ -cell relationships. *Medical Sciences*, 1994, Vol.91, 10878-10882

## M

---

Modlin IM, Pavel M, Kidd M & Gustafsson NI, Review article: somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumours. *Aliment Pharmacol Ther* 31, 2009, 169-188

Mohamed-Ali V, Pinkney JH & Coppack SW, Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *International Journal of Obesity* 22, 1998, 1145-1158

## O

---

Orci L, Baetens D, Rufener C, Amherdt M, Ravazzola M, Studer P, Malaisse-Lagae F & Unger RH, Hypertrophy and hyperplasia of somatostatin-containing D-cells in diabetes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1976, Vol.73, No.4, 1338-1342

## P

---

Patel YC & Reichlin S, Somatostatin in Hypothalamus, Extrahypothalamic Brain and Peripheral Tissues of the Rat. *Endocrinology*, 1978, Vol.102, No.2, 523-530

Patel YC & Srikant CB, Somatostatin Receptors. *Trends Endocrinol Metab*, 1997, 8, 398-405

Patel YC, Somatostatin and Its Receptor Family. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20, 1999, 157-198

Patel RC, Kumar U, Lamb DC, Eid JS, Rocheville M, Grant M, Rani A, Hazlett T, Patel SC, Gratton E & Patel YC, Ligand binding to somatostatin receptors induces receptor-specific oligomer formation in live cells. *PNAS*, 2002, Vol.99, No.5, 3294-3299

Prentki M & Nolan CJ, Islet  $\beta$  cell failure in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 2006, Vol.116, No.7, 1802-1812

## Q

---

Quesada I, Tuduri E, Ripoll C & Nadal A, Physiology of the pancreatic  $\alpha$ -cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes. *Journal of Endocrinology*, 2008, Vol.199, 5-19

## R

---

Rajala MW & Scherer PE, Minireview: The Adipocyte - At the Crossroads of Energy Homeostasis, Inflammation, and Atherosclerosis. *Endocrinology*, 2003, Vol.144, No.9, 3765-3773

Robertson RP, Harmon J, Phuong Oanh T. Tran & Poitout V,  $\beta$ -Cell Glucose Toxicity, Lipotoxicity, and Chronic Oxidative Stress in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 53 (Suppl.1), 2004, 119-124

Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC & Patel YC, Receptors for Dopamine and Somatostatin: Formation of Hetero-Oligomers with Enhanced Functional Activity. *Science*, 2000, Vol.288, 154-157

Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Sasi R, Patel RC, & Patel YC, Subtypes of the Somatostatin Receptor Assemble as Functional Homo- and Heterodimers. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, Vol.275, No.11, 7862-7869

Roger H & Unger MD, Reinventing Type 2 Diabetes. *Pathogenesis, Treatment and Prevention. JAMA*, 2008, Vol.299, No.10, 1185-1187

## S

---

Samols E, Stagner J I, Ewart RBL & Marks V, The Order of Islet Microvascular Cellular Perfusion Is B-A-D in the Perfused Rat Pancreas. *J. Clin. Invest.*, 1988, Vol.82, 350-353

Seufert J, Leptin Effects on Pancreatic  $\beta$ -Cell Gene Expression and Function. *Diabetes* 53 (Suppl.1), 2004, 152–158

Shah P, Vella A, Basu A, Basu R, Schwenk WF & Rizza RA, Lack of Suppression of Glucagon Contributes to Postprandial Hyperglycemia in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2000, Vol.85, No.11, 4053-4059

Shao S, Fang Z, Yu X & Zhang M, Transcription factors involved in glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic beta cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 384, 2009, 401–404

Singh V, Brendel MD, Zacharias S, Mergler S, Jahr H, Wiedenmann B, Bretzel RG, Plöckinger U & Strowski MZ, Characterization of Somatostatin Receptor Subtype-Specific Regulation of Insulin and Glucagon Secretion: An in Vitro Study on Isolated Human Pancreatic Islets. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006, 92(2), 673–680

Strowski MZ & Blake AD, Function and expression of somatostatin receptors of the endocrine pancreas. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008, 286, 169-179

## T

Takada K, Kanatsukaa A, Tokuyamaa Y, Yagui K, Nishimurab M, Saito Y, Makino H, Islet amyloid polypeptide/amylin contents in pancreas change with increasing age in genetically obese and diabetic mice. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 1996, 33, 153-158

Trayhurn P & Beattie JH, Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2001, 60, 329-339

## U

Unger RH, Dobbs RE & Orci L, Insulin, Glucagon, and Somatostatin Secretion in the Regulation of Metabolism. *Ann. Rev. Physiol.*, 1978, 40, 307-343

Unger RH, Lipotoxicity in the Pathogenesis of Obesity-Dependent NIDDM. Genetic and Clinical Implications. *Diabetes*, 1995, 44, 863-870

## W

Waki H & Tontonoz P, Endocrine Functions of Adipose Tissue. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 2007, 2, 31–56

Wang H, Iezzi M, Theander S, Antinozzi PA, Gauthier BR, Halban PA, Wollheim CB, Suppression of Pdx-1 perturbs proinsulin processing, insulin secretion and GLP-1 signalling in INS-1 cells. *Diabetologia*, 2005, 48, 720–731

Wang L, Tang K, Zhang Q, Li H, Wen Z, Zhang H & Zhang H, Somatostatin Receptor-Based Molecular Imaging and Therapy for Neuroendocrine Tumors. *BioMed Research International*, 2013, Vol.2013, 1-11

Wang J, Li Y, Mao Z, Hu B, Jiang X, Song B, Wang X, Zhu Y & Wang H, Clinical applications of somatostatin analogs for growth hormone-secreting pituitary adenomas. *Dovepress, Patient Preference and Adherence*, 2014, 8, 43–51

Weckbecker G, Raulf F, Stolz B & Bruns C, Somatostatin Analogs for Diagnosis and Treatment of Cancer. *Pharmac. Ther.*, 1993, Vol.60, 245-264

Weir GC & Bonner-Weir S, Islets of Langerhans: The Puzzle of Intra-islet Interactions and Their Relevance to Diabetes. *J. Clin. Invest.*, 1990, Vol.85, 983-987

Weir GC, Schwarz JA & Mathe CJ, Inhibition of Glucagon and Insulin Secretion From the Perfused Rat Pancreas by a B-Cell-Selective Somatostatin Analog. *Metabolism*, 1980, Vol.29, No.1, 68-70

Weyer C, Bogardus C, Mott DM & Pratley RE, The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, 1999, Vol.104, 787–794

## Z

---

Zhou G, Liu S-H, Shahi KM, Wang H, Duan X, Lin X, Feng X-H, Li M, Fisher WE, DeMayo FJ, Dawson D & Brunnicardi FC, Negative Regulation of Pancreatic and Duodenal Homebox-1 by Somatostatin Receptor Subtype 5. *Mol Endocrinol*, 2012, Vol.26, No.7, 1225-1234

## IV Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Die Abbildung zeigt ein ex vivo perfundiertes Pankreas der Ratte. 1a: antergrade Perfusion mit Anti-Insulin-Antikörper, 1b: retrograde Perfusion mit Anti-Insulin-Antikörper. Bei der anterograden Perfusion hemmt Insulin die A-Zelle und somit die Bildung von Glukagon (-). Anti-Insulin-Antikörper reduziert die Konzentration von Insulin und somit einen Anstieg der Glukagon-sekretion (+). Bei Fehlen von Insulin (retrograde Perfusion) kommt es zu einer erhöhten Konzentration von Glukagon. Glukagon stimuliert die Beta-Zelle und somit die Bildung von Insulin (+). Anti-Insulin-Antikörper hat keinen Effekt bei der retrograden Perfusion (basierend aus Salmos E. et al. 1988)..... Seite 2
- Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Regulation zwischen Glukagon, Insulin und SST..... Seite 4
- Abbildung 3:** Schematische Darstellung von SSTR (Lamberts et al 1996). ..... Seite 8
- Abbildung 4:** Verteilungsmuster der SSTRs (basierend auf Barnett P. 2003). ..... Seite 9
- Abbildung 5:** Steigerung der Proinsulin mRNA Expression in INS-1E Zellen durch Exendin-4 (GLP-1 Agonist). Die Balken repräsentieren Messungen, die aus 3 – 4 unabhängigen Experimenten +/- SEM ermittelt wurden. Als 100% (basale Sekretion) wurde die Konzentration des freigesetzten Insulins aus INS-1E Zellen definiert, die in einer Pufferlösung ohne Zugabe von Exendin-4 (10 mmol/l) inkubiert wurde. \*\*\*p < 0,001 ..... Seite 24
- Abbildung 6:** SST und ein SSTR2-Agonist reduzieren die Exendin-4-stimulierte Proinsulin-mRNA Expression in INS-1E Zellen. Zeitabhängiger Verlauf der Proinsulin-mRNA Expression. Als 100% wurde die Kontrolle definiert (Zellen inkubiert im Medium ohne Zusatz von SST oder SSTR-Agonisten). Messpunkte repräsentieren Mittelwerte +/- SEM ermittelt aus n = 3 – 4 unabhängigen Experimenten. \*\*p < 0,01 vs Zeitpunkt Null..... Seite 25
- Abbildung 7a:** Effekte von GLP-1, SST sowie ein SSTR2-selektiver Agonist auf die Aufnahme von Glukose in die INS-1E-Zellen (a). Messpunkte repräsentieren Mittelwerte +/- SEM ermittelt aus n = 3 – 4 unabhängigen Experimenten. \*\*p < 0,01 vs. GLP-1 behandelte Zellen..... Seite 26

- Abbildung 7b:** Western Blot zur Detektion des Glut-2 Proteins in Plasmamembranen der INS-1E Zellen nach Inkubation mit GLP-1 mit und ohne SSTR2-Agonist. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge erfolgte die Visualisierung der auf die Membran transferierten Proteine mit Pronceau Färbung..... Seite 27
- Abbildung 8:** SST und ein SSTR2-selektiver Agonist hemmen die Exendin-4-stimulierte INS-1E Zellproliferation. Mittelwerte +/- SEM ermittelt aus n = 3 – 4 unabhängigen Experimenten. \*p < 0,05 im Vergleich zu Exendin-4 behandelten Zellen..... Seite 27
- Abbildung 9:** Hemmung der IGF-1-stimulierten INS-1E Proliferation durch 100 nmol/l SST in 3 mmol/l glukosehaltigem Inkubationspuffer. IGF-1 wurde in den folgenden Konzentrationen eingesetzt: 0,5 ng/ml, 5,0 ng/ml, 50 ng/ml. Mittelwerte +/- SEM ermittelt aus n = 3 – 4 unabhängigen Experimenten. \*p < 0,05 ..... Seite 28
- Abbildung 10:** Glukoseunabhängige Stimulation der INS-1E Zellproliferation durch IGF1 (50 ng/ml). Hemmung der IGF-1 stimulierten Zellproliferation durch 100 nmol/l SST. Die Balkenfarben stellen die Konzentrationen an Glukose im Inkubationspuffer dar: blau: 3,0 mM, orange: 5,5 mM, grau: 16,7 mM. Mittelwert +/- SEM ermittelt aus n = 3 – 4 unabhängigen Experimenten. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 im Vergleich zu IGF-1-Stimulation..... Seite 29
- Abbildung 11:** SST (100 nmol/l) und SSTR2-selektiver Agonist (100 nmol/l) vermindert die Phosphorylierung von Foxo-1 (p-Foxo-1) und steigert Foxo-1 Akkumulation im Zellkern von INS-1E Zellen. Es sind Banden in repräsentativen Western Blots gezeigt. .... Seite 30
- Abbildung 12:** SST hemmt zeitabhängig die basale Phosphorylierung von Akt (pAkt)..... Seite 30
- Abbildung 13:** Zeitabhängige Hemmung der IGF-1-stimulierten Tyrosinrest-Phosphorylierung der p85 Untereinheit der Phosphatidylinositol 3-Kinase durch SST, \*p < 0,5, \*\*\*p < 0,001. Nur nach 10 und 60 Minuten waren die Unterschiede signifikant was die Hemmung von IGF-1 durch SST betrifft. .... Seite 31
- Abbildung 14:** Zeitabhängige Hemmung der IGF-1-stimulierten Phosphorylierung von pAKT durch SST. IGF-1 wurde in einer Konzentration von 50 ng/ml eingesetzt, SST in einer Konzentration von 100 nmol/l. Messpunkte repräsentieren Mittelwerte +/- SEM ermittelt aus n = 3 – 4 unabhängigen Experimenten, \*p < 0,5, \*\*p < 0,01 ..... Seite 32

- Abbildung 15:** Stimulation der PDX-1-Proteinproduktion durch Exendin-4 und Hemmung der Exendin-4-stimulierten PDX-1 Proteinproduktion durch SST und einen SSTR2-Agonisten. \*\*\* $p < 0,001$  im Vgl. zur basalen Kontrolle; # $p < 0,05$  i. Vgl. zu Exendin-4-stimulierten PDX-1 Proteinproduktion. Bas: basale Expression; Exe-4: Exendin-4 (10 nmol/l); SST: Somatostatin (100 nmol/l), SSTR2: SSTR-2-selektiver Agonist (100 nmol/l). Seite 33
- Abbildung 16:** SST (100 nmol/l) hemmt die Expression von IGF-Rezeptor 1 (IGF-R1), IGF-Rezeptor 2 (IGF-R2) und Insulin-Rezeptor (Ins-R) in INS-1E Zellen nach 24- oder 48 Stunden. \* $p < 0,5$ , \*\* $p < 0,01$  vs. unbehandelte Kontrollzellen. .... Seite 34
- Abbildung 17:** Vereinfachte, modellhafte, graphische Darstellung der Wirkungen eines SSTR2-selektiven Agonisten auf die Aktivität/Phosphorylierung von PDX-1, Akt und Foxo-1 (Foxo-1 = FKHR = forkhead found in human rhabdomyosarcoma). .... Seite 35
- Abbildung 18:** Expression von SSTR1 – SSTR5 in differenzierten und in undifferenzierten 3T3-L1 Zellen sowie in Adipozyten der Ratte (Null = nicht detektierbar, nd = nicht getestet). .... Seite 36
- Abbildung 19:** Relative Veränderung der SSTR-Expressionen in differenzierten 3T3-L1 Adipozyten. Daten zeigen x-fache Steigerung oder Reduktion der Expression im Vergleich zu undifferenzierten Zellen. Einschränkung: Es sind Daten aus nur einem Experiment erfasst. Daher konnte eine statistische Analyse nicht durchgeführt werden. .... Seite 36
- Abbildung 20:** SST und SSTR2-selektiver Agonist stimulieren die Lipolyse und mindern die antilipolytische Aktivität von Insulin. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM (grau) aus 3–5 unabhängigen Experimenten. .... Seite 37
- Abbildung 21:** SST und SSTR2-Agonist potenzieren die Glukagon-stimulierte Lipolyse. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM (grau) aus 3–5 unabhängigen Experimenten. .... Seite 38
- Abbildung 22:** SST und SSTR2-Agonist inhibieren die basale sowie die Insulin-stimulierte Lipogenese. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM (grau) aus 3 – 5 unabhängigen Experimenten. .... Seite 39
- Abbildung 23:** Oil red O zur Bestimmung und Visualisierung des Triglyceridgehaltes in 3T3-L1 Zellen nach Behandlung mit Insulin (Ins) und SST (SST14) in einem Zeitraum von 14 Tagen. .... Seite 40

## V Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Franziska Hofmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Funktionelle Bedeutung von Somatostatin für die pankreatischen Beta-Zellen und Adipozyten" 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/der Betreuer/in, 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

# VI Lebenslauf

Berlin, 16.05.2015

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.



## VII Danksagung

An dieser Stelle gilt mein erster und besonderer Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Mathias Strowski. Durch die hervorragende Betreuung und der unermüdlichen Geduld konnte diese Arbeit nun doch zu Ende gebracht werden.

Meinen herzlichen Dank verdienen ebenfalls, Marek Skrzypski Eva Göncz, Sylvia Zacharias, Yvonne Giesecke und Ines Eichhorn der AG Strowski und AG Grötzinger für die zahlreiche Hilfe im Labordschungel. Durch deren kompetente und nette Unterstützung konnten unlösbar geglaubte Probleme gelöst werden.

Weiterhin danke ich allen Menschen, die mich auf diesem Weg begleitet haben. Hierzu zählt Stephan Hill, der den nötigen Motivationsschub gebracht hat. Außerdem Mathias Rietschel, der durch seine erstklassige Hilfe im Bereich Formatierung dieser Arbeit den großartigen Rahmen gegeben hat.

Außerdem möchte ich meiner Familie und Freunden danken. Liebe Eltern, liebe Geschwister und lieber Thomas Wentzel, ihr habt es geschafft meinen Kummer und meine Launen zu ertragen und aufzufangen. Ihr seid toll!